

## 日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

17.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 4月17日

出願番号

Application Number:

特願2002-115529

REC'D 13 JUN 2003

WPO PCT

[ST.10/C]:

[JP2002-115529]

出願人

Applicant(s):

大正製薬株式会社

BEST AVAILABLE COPY

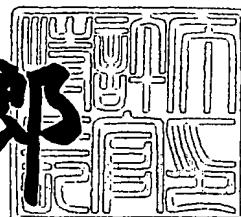
**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月27日

特許長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3038850

【書類名】 特許願  
 【整理番号】 00TS-P3320  
 【あて先】 特許庁長官殿  
 【発明者】  
 【住所又は居所】 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社  
 内  
 【氏名】 池田 明子  
 【発明者】  
 【住所又は居所】 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社  
 内  
 【氏名】 篠永 英樹  
 【発明者】  
 【住所又は居所】 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社  
 内  
 【氏名】 藤本 奈津子  
 【発明者】  
 【住所又は居所】 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社  
 内  
 【氏名】 葛西 陽子  
 【特許出願人】  
 【識別番号】 000002819  
 【氏名又は名称】 大正製薬株式会社  
 【代表者】 上原 明  
 【代理人】  
 【識別番号】 100074114  
 【弁理士】  
 【氏名又は名称】 北川 富造  
 【電話番号】 03-3985-1111

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003551

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9703058

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 育毛剤

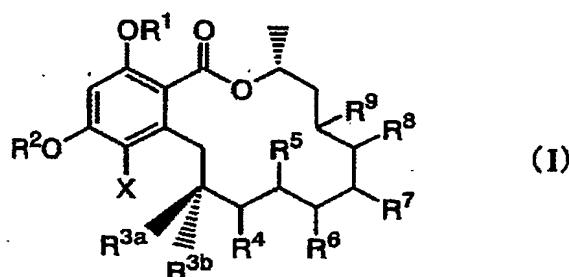
【特許請求の範囲】

【請求項1】 WNT-5Aの機能阻害活性を有する化合物を含有する毛乳頭細胞増殖促進剤。

【請求項2】 WNT-5Aの機能を阻害する化合物がWNT-5A産生抑制剤である、請求項1に記載の毛乳頭細胞増殖促進剤。

【請求項3】 式(I)

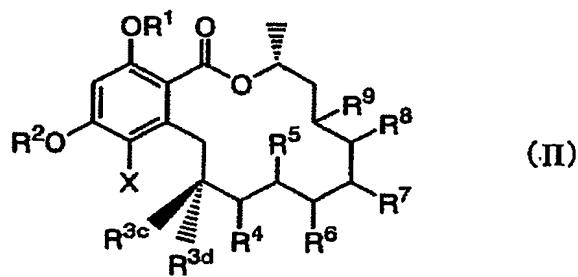
【化1】



(式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は同一又は異なって水素原子、C<sub>1-6</sub>アルキル基又はC<sub>2-6</sub>アルカノイル基を示し、Xは水素原子又はハロゲン原子を示し、R<sup>3a</sup>及びR<sup>3b</sup>は水素原子又は水酸基を示し、R<sup>3a</sup>が水素原子の場合R<sup>3b</sup>は水酸基であり、R<sup>3a</sup>が水酸基の場合R<sup>3b</sup>は水素原子であり、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>及びR<sup>9</sup>は同一又は異なって水素原子、水酸基、ハロゲン原子、C<sub>2-6</sub>アルカノイルオキシ基を示すか、又は隣り合う基が一緒になってパイ結合又はエーテル結合を形成するか、又はR<sup>5</sup>とR<sup>8</sup>もしくはR<sup>5</sup>とR<sup>9</sup>が一緒になってエーテル結合を形成する。)で表される化合物。

【請求項4】 式(II)

【化2】



(式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は同一又は異なって水素原子、C<sub>1-6</sub>アルキル基又はC<sub>2-6</sub>アルカノイル基を示し、Xは水素原子又はハロゲン原子を示し、R<sup>3c</sup>及びR<sup>3d</sup>は同一又は異なって水素原子、水酸基又はC<sub>1-6</sub>アルコキシ基を示すか、又はR<sup>3c</sup>及びR<sup>3d</sup>が一緒になってオキソ基、ヒドロキシイミノ基又はC<sub>1-6</sub>アルコキシイミノ基を形成し、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>及びR<sup>9</sup>は同一又は異なって水素原子、水酸基、ハロゲン原子、C<sub>2-6</sub>アルカノイルオキシ基を示すか、又は隣り合う基が一緒になってパイ結合又はエーテル結合を形成するか、又はR<sup>5</sup>とR<sup>8</sup>もしくはR<sup>5</sup>とR<sup>9</sup>が一緒になってエーテル結合を形成する。)で表される化合物を含有する毛乳頭細胞増殖促進剤。

【請求項5】請求項1、2又は4に記載の毛乳頭細胞増殖促進剤を有効成分とする発毛剤又は育毛剤。

【請求項6】WNT-5Aの機能を阻害する化合物を選択することを特徴とする、毛乳頭細胞増殖促進剤のスクリーニング方法。

【請求項7】下記(a)乃至(c)の工程を含むことを特徴とする請求項6記載の方

- (a)ヒトWNT-5A発現細胞を化合物を添加した培地を用いて培養する工程：
- (b)工程(a)で培養したヒトWNT-5A発現細胞を溶解してRNAを抽出し、WNT-5A mRNA量を測定する工程：及び
- (c)工程(b)で測定したWNT-5A mRNA量を比較する工程。

#### 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、毛乳頭細胞増殖促進剤、発毛剤及び育毛剤に関するものである。具体的には、WNT-5Aの機能阻害物質を有効成分とする毛乳頭細胞増殖促進剤、発毛剤及び育毛剤に関するものである。また、WNT-5A機能阻害作用に基づく毛乳頭細胞増殖促進剤のスクリーニング方法に関するものである。

## 【0002】

## 【従来の技術】

ヒト毛髪毛包は、角化細胞、毛乳頭細胞、纖維芽細胞、及び脂腺細胞等の様々な上皮系及び真皮間様系の細胞から構成されており、これらの細胞間相互作用を介して、毛髪の成長サイクル（毛周期）が調節されている。毛の本体は、毛包角化細胞の増殖／分化（角化）により形成されるが、この毛包角化細胞の増殖、分化、及びアボトーシスを制御し、毛周期調節の中心的な役割を担っているのは、毛乳頭である。したがって、発毛剤／育毛剤を開発する上で毛乳頭細胞に対する作用を研究することは重要と考えられる。しかし、これまでに毛乳頭細胞の増殖能及び毛周期調節能を制御する分子機構についてはほとんど明らかにされていない。

## 【0003】

一方、WNT-5AはWNTファミリーに属する分泌性糖蛋白質である。WNTファミリーには、約20種類の分子が存在し、各分子は線虫から哺乳類まで広く保存されている。これらWNTsは、胎生期の体軸形成や器官形成を制御している重要な細胞間シグナル分子であることが知られている（Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 14, 59-88 (1998)、Genes&Dev. 11, 3286-3305 (1997)）。WNTsの受容体は、7回膜貫通型のFrizzledで、ヒトでは10種類が存在する（Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 14, 59-88 (1998)、Genes&Dev. 11, 3286-3305 (1997)）。WNTとFrizzledの結合の組み合わせに依存して、3種類のシグナル伝達経路（WNT/ $\beta$ -カテニン経路、PCP経路、WNT/ $Ca^{2+}$ 経路）が存在する（Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 14, 59-88 (1998)）。

## 【0004】

アフリカツメガエルWNT-5A mRNA をヒトFrizzled5 mRNAとともにアフリカツメガエル初期胚に注入すると、2次体軸が誘導される。一方で逆にWNT-1やWNT-8

mRNAの注入により誘導される二次体軸形成をWNT-5Aが抑制することも報告されている (J.Cell Biol.133,1123-1137(1996))。また、アフリカツメガエルWNT-5Aは、ラットFrizzled2と結合し、Ca<sup>2+</sup>経路を介してCamKII (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II) とPKC (protein kinase II) が活性化されることが示されているが (Dev. Biol. 182, 114-120 (1997)、Curr. Biol. 9, 695-698 (1999) )、生理的な意味が解明されておらず、WNT-5Aと発毛／育毛との関連性については何ら報告はない。

## 【0005】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、毛乳頭細胞の増殖を制御する分子を用いたスクリーニング方法、毛乳頭細胞増殖促進剤並びに新規な作用に基づく発毛剤又は育毛剤を提供することを目的とする。

## 【0006】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは銳意研究の結果、毛乳頭細胞にWNT-5Aが高発現していること、WNT-5A が毛乳頭細胞の増殖能に関与することを発見した。さらにこの知見に基づき検討を重ねた結果、WNT-5Aの機能を阻害することにより毛乳頭細胞の増殖を顕著に促進することを見出し、本発明を完成するに至った。

## 【0007】

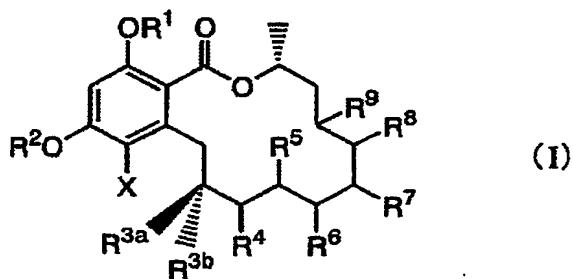
すなわち、本発明は、WNT-5Aの機能阻害活性を有する化合物を含有する毛乳頭細胞増殖促進剤である。

また、本発明は、WNT-5A産生抑制作用を有する化合物を含有する毛乳頭細胞増殖促進剤である。

また、本発明は、式 (I)

## 【0008】

【化3】



【0009】

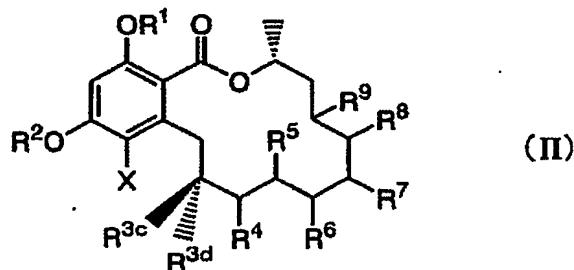
(式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は同一又は異なって水素原子、C<sub>1-6</sub>アルキル基又はC<sub>2-6</sub>アルカノイル基を示し、Xは水素原子又はハロゲン原子を示し、R<sup>3a</sup>及びR<sup>3b</sup>は水素原子又は水酸基を示し、R<sup>3a</sup>が水素原子の場合R<sup>3b</sup>は水酸基であり、R<sup>3a</sup>が水酸基の場合R<sup>3b</sup>は水素原子であり、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>及びR<sup>9</sup>は同一又は異なって水素原子、水酸基、ハロゲン原子、C<sub>2-6</sub>アルカノイルオキシ基を示すか、又は隣り合う基が一緒になってパイ結合又はエーテル結合を形成するか、又はR<sup>5</sup>とR<sup>8</sup>もしくはR<sup>5</sup>とR<sup>9</sup>が一緒になってエーテル結合を形成する。)で表される化合物である。

【0010】

また、本発明は、式(II)

【0011】

【化4】



【0012】

(式中、R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>は同一又は異なって水素原子、C<sub>1-6</sub>アルキル基又はC<sub>2-6</sub>アルカノイル基を示し、Xは水素原子又はハロゲン原子を示し、R<sup>3a</sup>及びR<sup>3b</sup>は

同一又は異なって水素原子、水酸基又はC<sub>1-6</sub>アルコキシ基を示すか、又はR<sup>3c</sup>及びR<sup>3d</sup>が一緒になってオキソ基、ヒドロキシイミノ基又はC<sub>1-6</sub>アルコキシイミノ基を形成し、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>及びR<sup>9</sup>は同一又は異なって水素原子、水酸基、ハロゲン原子、C<sub>2-6</sub>アルカノイルオキシ基を示すか、又は隣り合う基が一緒になってパイ結合又はエーテル結合を形成するか、又はR<sup>5</sup>とR<sup>8</sup>もしくはR<sup>5</sup>とR<sup>9</sup>が一緒になってエーテル結合を形成する。)で表される化合物を含有する毛乳頭細胞増殖促進剤である。

また、本発明は、上記毛乳頭細胞増殖促進剤を有効成分とする発毛剤である。

また、本発明は、WNT-5Aの機能を阻害する物質を選択することを特徴とする、毛乳頭細胞増殖促進剤のスクリーニング方法である。

また、本発明は、WNT-5Aの機能を阻害する物質を選択する方法であって、下記(a)乃至(c)の工程を含むことを特徴とする毛乳頭細胞増殖促進剤のスクリーニング方法である。

(a)ヒトWNT-5A発現細胞を化合物を添加した培地を用いて培養する工程：

(b)工程(a)で培養したヒトWNT-5A発現細胞を溶解してRNAを抽出し、WNT-5A mRNA量を測定する工程：及び

(c)工程(b)で測定したWNT-5A mRNA量を比較する工程。

#### 【0013】

#### 【発明の実施の形態】

以下、本発明を更に具体的に説明する。

#### 【0014】

#### <WNT-5Aの機能を阻害する化合物>

本発明において「WNT-5Aの機能を阻害する化合物」(以下、「WNT-5A機能阻害剤」ということがある。)とは、WNT-5AとWNT-5A受容体の結合を阻害する化合物、又は、WNT-5Aの産生を抑制する化合物を意味し、好ましくはWNT-5Aの産生を抑制する化合物である。

#### 【0015】

WNT-5Aは、ヒト、マウス、ラット、アフリカツメガエル等でその発現が確認されているWNTファミリーに属する分泌性糖蛋白質であるが、医薬品として使用す

る点からヒトのWNT-5A（配列番号1）機能を阻害する化合物が好ましい。

## 【0016】

WNT-5AとWNT-5A受容体の結合を阻害する化合物とは、WNT-5A又はWNT-5A受容体に作用することによりWNT-5AとWNT-5A受容体の結合を阻害し、WNT-5Aによるシグナル伝達を抑制するものを意味し、好ましくはCa<sup>2+</sup>経路を介したシグナル伝達を抑制する化合物であり、例えば、WNT-5A受容体アンタゴニストを挙げることができる。WNT-5A受容体としては、具体的には例えば、ヒトFrizzled5（配列番号4）、ラットFrizzled2（配列番号6）を挙げることができる。当該化合物は、ペプチド性でも非ペプチド性でもよいが、作用時間が長い利点がある非ペプチド性の阻害剤が好ましい。また、当該化合物は、標識したWNT-5A及びWNT-5A受容体を用いたスクリーニング系により選択することができ、好ましくはIC50が10μg/ml以下のものである。

## 【0017】

WNT-5A産生を抑制する化合物とは、WNT-5A遺伝子の発現を抑制する化合物を意味する。当該化合物は、ペプチド性でも非ペプチド性でもよいが、作用時間が長い利点がある非ペプチド性の阻害剤が好ましい。また、当該化合物は、WNT-5A蛋白質量（配列番号1）又は指標WNT-5A mRNA量（配列番号2）の減少を指標として選択することができ、好ましくはHartleyらの方法（DRUG METABOLISM AND DISPOSITION 28(5), 608-616 (2000)）に準じた核酸プローブアッセイ方法によりIC50が10μg/ml以下のものである。更に好ましくは、式（II）で表される化合物である。

## 【0018】

式（II）で表される化合物においてC<sub>1-6</sub>アルキル基とは、炭素数1～6の直鎖又は分枝鎖状のアルキル基を意味し、具体的には、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基、2-エチルプロピル基、ヘキシル基等が挙げられる。

## 【0019】

C<sub>2-6</sub>アルカノイル基とは、炭素数2～6の直鎖又は分枝鎖状のアルカノイル基を意味し、具体的には、例えばアセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、t

一ブチリル基などである。

## 【0020】

$C_{1-6}$ アルコキシ基とは、炭素数1～6の直鎖又は分枝鎖状のアルコキシ基を意味し、具体的には、例えばメトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、ブトキシ基、イソブトキシ基、sec-ブトキシ基、tert-ブトキシ基、ペンチロキシ基、イソペンチロキシ基、ネオペンチロキシ基、tert-ペンチロキシ基、1-メチルブトキシ基、2-メチルブトキシ基、1, 2-ジメチルプロポキシ基、ヘキシロキシ基、イソヘキシロキシ基等が挙げられる。

## 【0021】

$C_{1-6}$ アルコキシイミノ基とは、炭素数1～6の直鎖又は分枝鎖状のアルコキシイミノ基を意味し、具体的には、例えばN-メトキシイミノ基、N-エトキシイミノ基、N-プロポキシイミノ基、N-イソプロポキシイミノ基、N-ブトキシイミノ基、N-イソブトキシイミノ基、N-ペンチルオキシイミノ基、N-ヘキシルオキシイミノ基等が挙げられる。

## 【0022】

$C_{2-6}$ アルカノイルオキシ基とは、炭素数2～6の直鎖又は分枝鎖状のアルカノイルオキシ基を意味し、具体的には、例えばアセトキシ基、プロピオニルオキシ基、ピバロイルオキシ基等が挙げられる。

## 【0023】

エーテル結合とは、-〇-、式 $-(CH_2)^m-0-(CH_2)^n-$ （式中、 $m$ 及び $n$ はそれぞれ1～3の整数を表し、式中のアルキレン基はアルキル基で置換されていてよい。）又は、式 $-0-(CH_2)^m-0-$ （式中、 $m$ は1～3の整数を表し、式中のアルキレン基はアルキル基で置換されていてよい。）を意味する。

## 【0024】

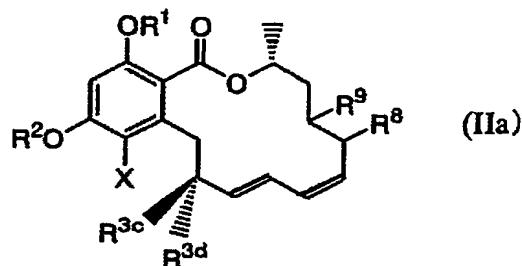
パイ結合又はエーテル結合を形成する隣り合う基の組み合わせとしては、（ $R^4$ と $R^5$ ）、（ $R^5$ と $R^6$ ）、（ $R^6$ と $R^7$ ）、（ $R^7$ と $R^8$ ）及び（ $R^8$ と $R^9$ ）を挙げることができる。

式（II）で表される化合物の中でより好ましくは式（I）で表される化合物であり、更に好ましくは $R^{3a}$ が水素原子であり、 $R^{3b}$ は水酸基である化合物である。

また、式(IIa)、式(IIb)、式(IIc)で表される化合物が好ましい。

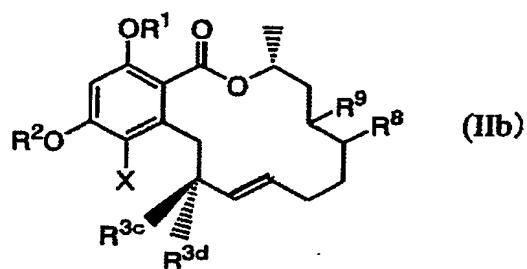
【0025】

【化5】



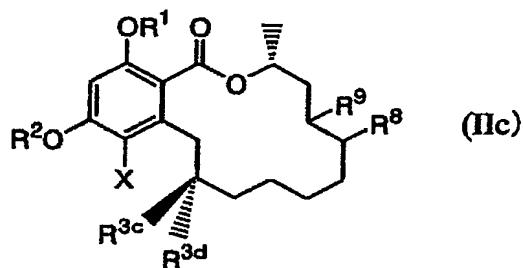
【0026】

【化6】



【0027】

【化7】



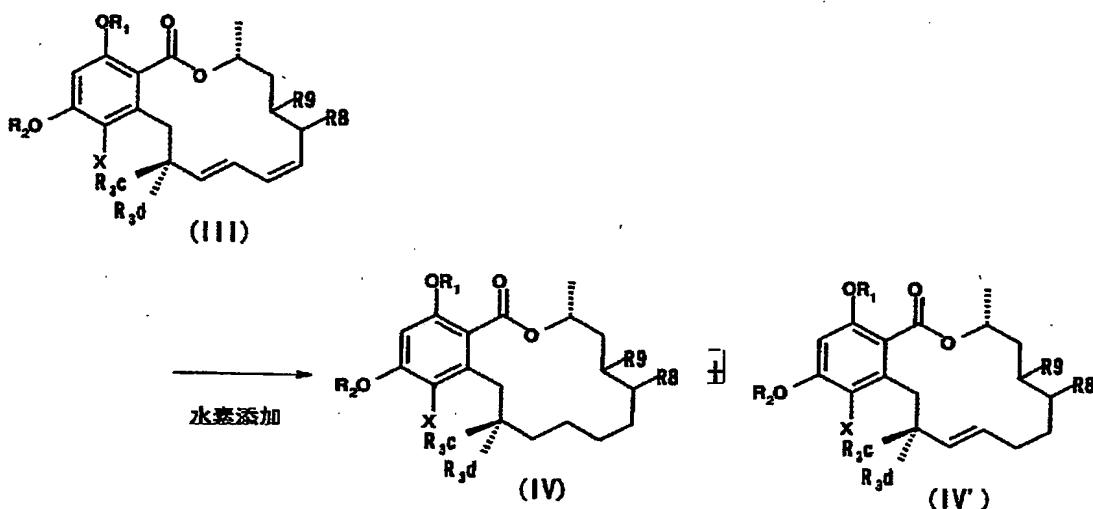
【0028】

(式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^{3c}$ 、 $\text{R}^{3d}$ 、 $\text{R}^8$ 、 $\text{R}^9$ 及び $\text{X}$ は前記と同意義である。)

式(II)で表される化合物は、例えば、以下の製法を組み合わせることにより製造することができる。

【0029】

【化8】反応式1



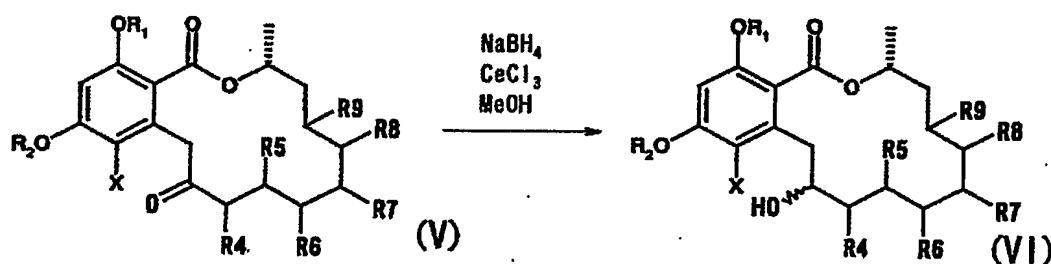
【0030】

(式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^{3c}$ 、 $\text{R}^{3d}$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$ 、 $\text{R}^6$ 、 $\text{R}^7$ 、 $\text{R}^8$ 、 $\text{R}^9$ 及び $\text{X}$ は前記と同意義である。)

式(III)の化合物をパラジウム炭素などの触媒存在下、有機溶媒（例えば、酢酸エチル、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、エチルアルコール、メチルアルコールなど）中、水素添加反応を行い、式(IV)あるいは式(IV')の化合物、もしくはこれらの混合物を得る。これらの式(IV)及び式(IV')の化合物はカラムクロマトグラフィーなど通常用いられる分離法にて分離精製することができる。

【0031】

【化9】反応式2



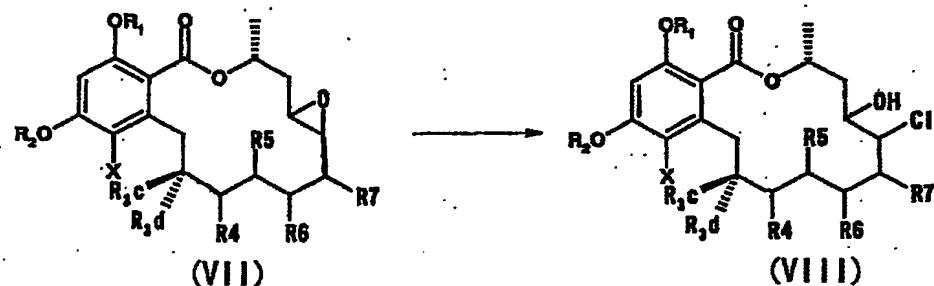
【0032】

(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^{3c}$ 、 $R^{3d}$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 及びXは前記と同意義である。)

式 (V) の化合物を水素化ホウ素カリウム、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウムなどの還元剤と、必要に応じて  $\text{LiCl}$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{CeCl}_3$ 、 $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{NiCl}_2$  等の塩類の共存下有機溶媒（例えば、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、エチルアルコール、メチルアルコールなど）中、-20~100°C、好ましくは 0~20°C で反応させ、式 (VI) の化合物を得る。式 (VI) の化合物はカラムクロマトグラフィーなど通常用いられる分離法にて分離精製することができる。

[0033]

### 【化 1 0】 反应式 3



[0034]

(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^{3c}$ 、 $R^{3d}$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 及びXは前記と同意義である。)

式(VII)の化合物を適當な有機溶媒(例えば、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、エチルアルコール、メチルアルコールなど)中、酸又は塩基で処理することにより、式(VIII)の化合物を得る。

[0035]

### 〈毛乳頭細胞增殖促進剤〉

本発明において「毛乳頭細胞増殖促進剤」とは、毛乳頭細胞の数を増加させる作用をもつ医薬又は試薬を意味する。

[0036]

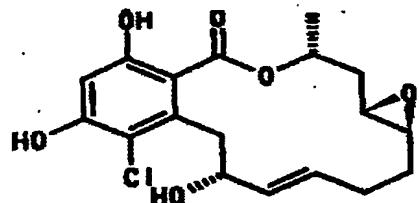
本発明の毛乳頭細胞増殖促進剤は、WNT-5A機能の阻害作用に基づくことを特徴とする。WNT-5Aは、WNT/ $\beta$ -catenin経路が活性化するWNT-1 classのWNTs(1, 8

など)の機能を抑制することから、WNT-5Aの機能の調整あるいはWNT-5Aの発現を調整することにより毛乳頭細胞の増殖を制御する。したがって、優れたWNT-5A機能の阻害作用を有すれば、全く構造の異なる化合物(例えば、化合物7や化合物24など)であっても、優れた毛乳頭細胞増殖促進作用を有する。

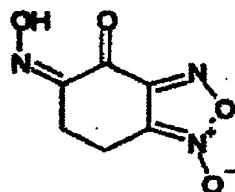
【0037】

【化11】

### 化合物7



### 化合物24



【0038】

細胞の増殖は、当業者に公知の方法により測定することができ、例えば適当な発色基質を用いた生細胞数計測、[3H]-チミジン取り込み法等を挙げることができる。発色基質としては、MTT、MTS、XTT等のテトラゾリウム塩を用いることが好ましい。

【0039】

#### <発毛剤／育毛剤>

本発明において「発毛剤又は育毛剤」とは、発毛誘導、毛成長促進、脱毛予防などの目的で使用される医薬品又は医薬部外品を意味する。本発明の発毛剤／育毛剤を医薬として用いる場合、適用対象としては、例えば円形脱毛症や脱毛症の改善あるいは予防などを挙げることができる。

【0040】

また、本発明の発毛剤／育毛剤の効果は、WNT-5A機能の抑制に基づく毛乳頭細胞増殖促進作用による。かかる作用機序により脱毛部毛乳頭において低下している細胞増殖能を亢進し、発達した毛乳頭組織を形成するため、これまでの育毛剤

／発毛剤では効果がえられなかった症状にも有効であることが予想される。

#### 【0041】

本発明の発毛剤／育毛剤は、それぞれの化合物に基づき、種々の投与量及び投与形態で投与することができる。

#### 【0042】

投与量は、育毛剤の種類、投与形態により異なるが、例えば、式（II）で表される化合物を塗布投与（ローション剤、軟膏剤、ゲル剤等）する場合、0.0001～10重量%で投与することができ、好ましくは0.001～5重量%、更に好ましくは0.001～1重量%である。また、式（II）で表される化合物を成人男性に経口投与（散剤、錠剤またはカプセル剤）する場合は、1～100mg/kg/日とすることが好ましい。

#### 【0043】

本発明の発毛剤／育毛剤の投与形態は特に限定されるものではないが、外用での使用では、WNT-5A産生抑制剤、例えば式（II）で表される化合物を有効成分とする発毛剤／育毛剤は水溶性組成物の形態で提供されることが好ましい。このような水溶性組成物の製造には、本発明の効果を損なわない限り医薬品、医薬部外品又は化粧品の製造に用いられる各種の添加物を配合することができる。本発明の発毛剤／育毛剤は、例えばヘアトニック、ヘアオイル、ヘアムース、ゲルなどの調髪用組成物、シャンプー、リンスなどの洗髪用組成物、或いは軟膏などとして提供することが可能である。

#### 【0044】

また、経口での使用では、WNT-5A産生抑制剤、例えば式（II）で表される化合物を製剤上許容しうる担体（賦形剤、結合剤、崩壊剤、矯味剤、矯臭剤、乳化剤など）、希釈剤、溶解補助剤などと配合して得られる医薬組成物を通常の方法に従って製剤して得られる錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、懸濁剤、溶液剤などの形態で提供されることが望ましい。

なお、これらの製剤化は、通常の製剤化技術を使用することができる

#### <スクリーニング方法>

本発明はまた、WNT-5Aの機能を阻害する化合物を選択することを特徴とする

、毛乳頭細胞増殖促進剤のスクリーニング方法である。

#### 【0045】

WNT-5Aの機能を阻害する化合物（以下、「WNT-5A機能阻害剤」ということがある。）を選択するとは、例えば、WNT-5A産生抑制剤を選択、即ちスクリーニングすることでもよく、また、WNT-5A受容体アンタゴニストを選択することでもよい。

#### 【0046】

本発明のスクリーニング方法に供される被験物質としては、任意の物質を使用することができる。被験物質の種類は特に限定されず、個々の低分子化合物でよいし、天然物抽出物中に存在する化合物でもよく、合成ペプチドでもよい。また、化合物ライブラリー、コンビナトリアルライブラリーであってもよい。化合物ライブラリーの構築は当業者に公知であり、また市販の化合物ライブラリーを使用することもできる。スクリーニングの対象とする化合物は、医薬品として用いる観点から分子量3000以下であることが好ましく、塗布／経口投与を可能とする観点から、分子量600以下の低分子化合物であることが好ましい。

#### 【0047】

##### ①WNT-5A受容体アンタゴニストのスクリーニング方法

WNT-5A受容体アンタゴニストのスクリーニング方法において、標識したWNT-5A蛋白質及びWNT-5A受容体を用いて、該標識を検出又は測定することにより、WNT-5A蛋白質とWNT-5A受容体の結合の形成の有無を調べてもよい。標識としては、放射性同位元素（<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P、<sup>131</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>35</sup>S等）、酵素（アルカリフェオヌクレオターゼ、ホースラディシュパーオキシターゼ等）、蛍光物質（フルオロセインイソチオシアネート等）等を挙げることができる。これらは市販のものを入手することができ、公知の方法によって標識される。

#### 【0048】

*in vitro*のアッセイ系の1つの具体例は、非細胞系において行われる。具体的にはWNT-5A蛋白質又はWNT-5A受容体のいずれか一方を支持体に結合させ、ここにもう一方と被検物質を加え、インキュベートした後洗浄して支持体に結合した蛋白質に対するもう一方の蛋白質の結合を検出又は測定すればよい。

## 【0049】

蛋白質を結合させる支持体としては、例えば不溶性の多糖類、例えば、アガロース、デキストラン、セルロース、合成樹脂、例えばポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等が挙げられる。より具体的にはそれらを原料として製造される市販のビーズ、プレートが用いられる。

## 【0050】

## ②WNT-5A産生抑制化合物のスクリーニング方法

WNT-5A産生抑制化合物のスクリーニングは、WNT-5A mRNA量又はWNT-5A蛋白質量を指標として行うことができる。また、WNT-5A遺伝子のプロモーター領域にレポーター遺伝子を連結して発現量を検出することもできる。WNT-5A遺伝子のプロモーターとしては、配列番号3を使用することが好ましい。

## 【0051】

レポーター遺伝子としては、例えば、GFP遺伝子(Green Fluorescent Protein)、GUS遺伝子( $\beta$ -Glucuronidase)、LUC遺伝子(Luciferase)、CAT(Chloramphenicol acetyltransferase)遺伝子を挙げることができる。

WNT-5A mRNA量を指標とした場合としては、例えば、ヒトWNT-5A発現細胞を用い、薬剤を添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub>-95%airのインキュベータ内で数時間培養後、細胞を溶解してRNAを抽出し、RT-PCRなどを用いてWNT-5A mRNA量を測定することにより、WNT-5A mRNA量を減少させる活性を有する物質を探索することができる。PCRに用いるプライマーとしては、WNT-5A mRNAに特異的なものであれば特に制限はなく、WNT-5A mRNAの配列から設計することができるが、好ましくは、Forward Primer AATGTCTCCAAGTTCTCCTAGTGGC(配列番号8)及びReverse Primer GATGTCGGAATTGATACTGGCA(配列番号9)である。

## 【0052】

WNT-5A蛋白質量を指標とした場合としては、例えば、ヒトWNT-5A発現細胞を用い、薬剤を添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub>-95%airのインキュベータ内で数時間培養後、培養培地を用いて又は細胞を溶解して蛋白質を抽出し、ELISAなどを用いてWNT-5A蛋白質量を測定することにより、WNT-5A蛋白質発現量を減少させる活性を有する物質を探索することができる。

## 【0053】

以下、実験例に基づき本発明を更に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

## 【0054】

## 【実施例】

## 実施例1（化合物3、4）

ラディシコール（化合物1：10.8g）を酢酸エチル（140ml）に溶解し、5%パラジウム炭素（ウェットタイプ）（255mg）を加え、水素置換（1気圧）し室温で3時間攪拌した。パラジウム炭素を濾過後、濾液を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィーにて精製し、n-ヘキサン：酢酸エチル=2：1で溶出させることで、目的化合物4（3.43g）を得、n-ヘキサン：酢酸エチル=3：2で溶出させることで、目的化合物3（4.14g）を得た。

## 【0055】

## 実施例2（化合物7、8）

化合物3（602.5mg）をメタノール（13ml）に溶解し、塩化セリウム（III）7水和物（2.14g）を加え、室温で30分間攪拌した。この溶液に水素化ホウ素ナトリウム（180mg）を氷冷しながら徐々に加えた後、室温で5分間攪拌した。反応液に飽和リン酸水素二ナトリウム（40ml）を加え水（40ml）で希釀した後、有機溶媒を減圧留去した。残った水層を酢酸エチル（300ml×2）で抽出し、得られた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー（20cm×20cm, 1.0mm厚、クロロホルム：メタノール=93：7で展開、酢酸エチルで溶出）により粗精製した。得られた粗精製物を高速液体クロマトグラフィー（20φ×250mm, YMC-Pack Pro C18, 水（酢酸添加、pH3.5）：アセトニトリル=65：35で溶出）により精製し、目的化合物（化合物7：144.9mg、化合物8：13.8mg）を得た。

## 【0056】

## 実施例3（化合物9,10）

化合物4（26.5mg）をメタノール（5ml）に溶解し、塩化セリウム（III）7水和物（100mg）を加え、室温で30分間攪拌した。この溶液に水素化ホウ素ナトリウム（60

mg)を氷冷しながら徐々に加えた後、室温で30分間攪拌した。反応液に飽和リン酸水素二ナトリウム(12ml)を加え水(20ml)で希釈した後、有機溶媒を減圧留去した。残った水層を酢酸エチル(30ml×2)で抽出し、得られた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー(20cm×20cm, 0.25mm厚、クロロホルム：メタノール=94:6で展開、酢酸エチルで溶出)により精製し、目的化合物(化合物9:5.7mg、化合物10:8.8mg)を得た。

## 【0057】

## 実施例4(化合物5)

ラディシコール(91.5mg)をメタノール(5ml)に溶解し、塩化セリウム(III)7水和物(88mg)を加え、室温で10分間攪拌した。この溶液に水素化ホウ素ナトリウム(60mg)を氷冷しながら徐々に加えた後、室温で30分間攪拌した。反応液に飽和リン酸水素二ナトリウム(20ml)を加え水(20ml)で希釈した後、有機溶媒を減圧留去した。残った水層を酢酸エチル(50ml×3)で抽出し、得られた酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー(20cm×20cm, 0.5mm厚、クロロホルム：メタノール=9:1で展開、酢酸エチルで溶出)により精製し、目的化合物5(27.2mg)を得た。

## 【0058】

## 実施例5(化合物2)

ラディシコール(15.3mg)をピリジン(1.5ml)に溶解し、無水酢酸(4ml)を加え室温で6.5時間攪拌した後、反応液に冰水(20ml)を加え酢酸エチル(20ml)で抽出した。酢酸エチル層を水(20ml×2)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー(20cm×20cm, 0.5mm厚、クロロホルム：メタノール=95:5で展開、酢酸エチルで溶出)により精製し、目的化合物2(18.5mg)を得た。

## 【0059】

## 実施例6(化合物11)

ラディシコール(19.0mg)をジメチルスルホキシド(1ml)に溶解し、炭酸カリウ

ム(3mg)とヨウ化メチル(4ml)を加え室温で6.5時間攪拌した。反応液に水(20ml)を加え酢酸エチル(20ml)で抽出し、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー(20cm×20cm, 0.5mm厚、クロロホルム：メタノール=95:5で展開、酢酸エチルで溶出)により精製し、目的化合物11(15.3mg)を得た。

## 【0060】

## 実施例7(化合物16、17、19、23)

ラディシコール(930mg)を1,4-ジオキサン(14ml)に溶解し、1規定塩酸(12ml)を加え室温で2時間攪拌した後、水(40ml)で希釈し酢酸エチル(100ml)で抽出した。酢酸エチルを無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー(20cm×20cm, 1.0mm厚、クロロホルム：メタノール:n-ヘキサン=5:1:5で展開、酢酸エチルで溶出)により粗精製した。得られた粗精製物を高速液体クロマトグラフィー(20φ×250mm, YMC-Pack Pro C18, 水(酢酸添加、pH3.5):アセトニトリル=70:30~40:60、グラジェントで溶出)により精製し、目的化合物(化合物16:11.4mg、化合物17:19.4mg、化合物19:32.6mg、化合物23:103.7mg)を得た。

## 【0061】

## 実施例8(化合物12、13)

ラディシコール(232.6mg)を1,4-ジオキサン(4ml)に溶解し、1規定塩酸(1ml)を加え室温で30分間攪拌した後、1規定水酸化ナトリウムで中和した。溶媒を減圧濃縮後メタノールを20ml加えて溶解させ、綿栓濾過後メタノールを減圧留去した。得られた残渣を高速液体クロマトグラフィー(20φ×250mm, YMC-Pack Pro C18, 水(酢酸添加、pH3.5):アセトニトリル=65:35で溶出)により精製し、目的化合物(化合物12:42.6mg、化合物13:10.4mg)を得た。

## 【0062】

## 実施例9(化合物18)

5mlのジメチルホルムアミドに1mlのオキシ塩化リンを氷冷しながら滴下した後、室温で30分間攪拌した。この溶液をラディシコール(98.5mg)のジメチルホルムアミド溶液(4ml)に氷冷しながら徐々に加えた後、室温で24時間攪拌した。反

応液を酢酸エチル(100ml)で希釈した後、水(100ml×3)で洗浄し、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、酢酸エチルを減圧留去した。得られた残渣をシリカゲル分取薄層クロマトグラフィー(20cm×20cm, 0.5mm厚、クロロホルム：メタノール=94:6で展開、酢酸エチルで溶出)により精製し、目的化合物(化合物18)(61.8mg)を得た。

## 【0063】

## 実施例10(化合物14、15)

ラディシユール(378mg)を1,4-ジオキサン(4ml)に溶解し、1規定塩酸(1ml)を加え室温で20分間攪拌した後、1規定水酸化ナトリウムで中和した。溶媒を減圧濃縮後メタノールを20ml加えて溶解させ、綿栓濾過後メタノールを減圧留去した。得られた残渣を高速液体クロマトグラフィー(20φ×250mm, YMC-Pack Pro C18, 水(酢酸添加、pH3.5)：アセトニトリル=70:30で溶出)により精製し、目的化合物(化合物14:10.7mg、化合物15:9.9mg)を得、同時に化合物12(40.6mg)も得られた。

## 【0064】

## 実施例11(化合物20、21、22)

化合物3(96.3mg)を1,4-ジオキサン(2ml)に溶解し、1規定塩酸(2.5ml)を加え室温で16時間攪拌した後、1規定水酸化ナトリウムで中和した。溶媒を減圧濃縮後メタノールを20ml加えて溶解させ、綿栓濾過後メタノールを減圧留去した。得られた残渣を高速液体クロマトグラフィー(20φ×250mm, YMC-Pack Pro C18, 水(酢酸添加、pH3.5)：アセトニトリル=45:55で溶出)により精製し、目的化合物(化合物20:9.3mg、化合物21:22.0mg、化合物22:26.2mg)を得た。

上記実施例にて合成した化合物及びそのデータを表1及び表2に示す。  
(表1中の化合物は式(I)又は(II)で表される。)

## 【0065】

【表1】表1

化 合 物	R1	R2	(R3C R3d)	R4	R5	R6	R7	R8	R9	X
	H	H	H	H	H	H	H	H	H	C1
1	H	H	=0	-0-	-0-	-0-	-0-	-0-	-0-	C1
2	Ac	H	=0	-0-	-0-	-0-	-0-	-0-	-0-	C1
3	H	H	=0	-0-	-0-	-0-	-0-	-0-	-0-	C1
4	H	H	=0	-0-	-0-	-0-	-0-	-0-	-0-	C1
11	He	H	=0	-0-	-0-	-0-	-0-	-0-	-0-	C1
12	H	H	H	H	H	H	H	H	H	C1
13	H	H	H	H	H	H	H	H	H	C1
14	H	H	H	H	H	H	H	H	H	C1
15	H	H	H	H	H	H	H	H	H	C1
17	H	H	H	H	H	H	H	H	H	C1
18										C1

\* 聚合 : -0-C(=O)H, , -0-

【表2】表1のつづき

化合物	R1	R2	R3c	R3d	R4	R5	R6	R7	R8	R9	X
5	H	H	H	OH						-0-	C1
6	H	H	OH	H						-0-	C1
7	H	H	H	OH						-0-	C1
8	H	H	OH	H						-0-	C1
9	H	H	H	OH						-0-	C1
10	H	H	H	OH						-0-	C1

化合物	R1	R2	(R3c R3d)	R4	R5	R6	R7	R8	R9	X
23	H	H	=0	H	-0-	$\pi$ 結合	OH	C1		

【0067】

【表3】表1のつづき

化合物	R1	R2	(R3c R3d)	R4	R5	R6	R7	R8	X
19	H	H	= 0	H	- 0 -	$\pi$ 複合	C1	C1	
20	H	H	= 0	H	- 0 -	H	C1	C1	
21	H	H	= 0	H	- 0 -	H	C1	C1	
22	H	H	= 0	H	- 0 -	H	C1	C1	

化合物	R1	R2	(R3c R3d)	R4	R5	R6	R7	R8	X
16	H	H	= 0	C1	$\pi$ 複合	$\pi$ 複合	O H	C1	

【0068】

【表4】表2

化合物番号	1H-NMR	13C-NMR
1	(CDCl <sub>3</sub> /CD3OD,500MHz) δppm: 1.48(d,J=6.7Hz,3H), 1.83(dd,J=15.3,9.6,3.7Hz,1H), 2.33(dt,J=15.3,3.7Hz,1H), 2.94(dt,J=9.6,3.0Hz,1H), 3.19(s,1H), 3.86(d,J=16.5Hz,1H), 4.51(d,J=16.5Hz,1H), 5.4 (sx,J=3.7Hz,1H), 5.78(dd,J=9.8,3.0Hz,1H), 6.05(d,J=15.9Hz,1H), 6.15(t,J=9.8Hz,1H), 6.45(s,1H), 7.48(dt,J=15.8,9.8Hz,1H)	(CDCl <sub>3</sub> /CD3OD,125MHz) δppm: 18.5(q), 36.3(t), 46.3(t), 55.8(d), 56.1(d), 71.2(d), 103.4(d), 108.0(s), 116.1(s), 130.1(a), 130.5(d), 135.0(d), 135.7(s), 139.6(d), 158.2(s), 161.2(s), 168.9(s), 199.1(s)
2	(CDCl <sub>3</sub> ,500MHz) δppm: 1.51(d,J=6.7Hz,3H), 1.54(dd,J=14.6,8.5,3.7Hz,1H), 2.24(s,3H), 2.31(s,3H), 2.38(dt,J=14.6,3.7Hz,1H), 2.99(dt,J=8.5,3.7Hz,1H), 3.49(qui,J=1.8Hz,1H), 3.91(d,J=15.9Hz,1H), 4.04(d,J=15.9Hz,1H), 5.37(dq,J=6.7,3.7Hz,1H), 5.74(dd,J=11.0,3.7Hz,1H), 6.03(d,J=16.5Hz,1H), 6.12(t,J=11.0Hz,1H), 7.02(s,1H), 7.45(dd,J=16.5,11.0Hz,1H)	(CDCl <sub>3</sub> /CD3OD,125MHz) δppm: 18.6(q), 20.6(q), 20.7(q), 37.1(t), 45.1(t), 55.0(d), 55.4(d), 70.8(d), 117.8(d), 126.3(s), 126.5(s), 129.9(d), 130.8(d), 133.6(s), 136.1(d), 139.1(a), 146.6(s), 148.7(s), 163.8(s), 167.5(s), 168.1(s), 195.8(s)
3	(CDCl <sub>3</sub> /CD3OD,500MHz) δppm: 1.21(m,1H), 1.41(d,J=6.1Hz,3H), 1.81(dt,J=15.8,4.3Hz,1H), 1.97(dd,J=15.9,4.9,2.4Hz,1H), 2.23(m,1H), 2.35(dd,J=4.0,7.3,2.4Hz,1H), 2.48(dd,J=7.3,3.7Hz,1H), 2.52(dt,J=9.8,2.4Hz,1H), 2.74(sext,J=2.4Hz,1H), 4.27(d,J=18.3Hz,1H), 4.40(d,J=8.3Hz,1H), 5.21(dq,J=6.1,4.3Hz,1H), 6.05(dd,J=15.9,1.2Hz,1H), 6.48(s,1H), 6.85(dd,J=5.9,11.0,4.3Hz,1H)	(CDCl <sub>3</sub> /CD3OD,125MHz) δppm: 17.8(q), 29.2(t), 30.9(t), 36.4(t), 45.1(t), 56.0(d), 57.6(d), 72.1(d), 103.5(d), 106.3(s), 116.3(s), 130.1(a), 136.1(s), 148.0(d), 158.8(s), 163.4(s), 170.3(s), 197.0(s)
4	(CDCl <sub>3</sub> /CD3OD,500MHz) δppm: 1.02(m,1H), 1.32(d,J=6.4Hz,3H), 1.38(m,1H), 1.41(m,2H), 1.64(m,1H), 1.77(dd,J=5.5,6.4,2.7Hz,1H), 1.92(dd,J=4.0,7.0,3.0Hz,1H), 2.04(dd,J=15.5,5.5,4.3Hz,1H), 2.34(m,2H), 2.53(dt,J=8.3,3.0Hz,1H), 2.68(m,1H), 4.02(d,J=18.3Hz,1H), 4.25(d,J=18.3Hz,1H), 5.15(d'qui,J=6.4,2.7Hz,1H), 6.37(s,1H)	(CDCl <sub>3</sub> /CD3OD,125MHz) δppm: 18.6(q), 22.1(t), 23.2(t), 30.8(t), 36.1(t), 40.3(t), 46.5(t), 54.8(d), 57.6(d), 70.8(d), 103.1(d), 106.4(s), 115.6(s), 135.6(s), 158.2(s), 162.2(s), 169.6(s), 208.0(s)
5	(CD3OD,500MHz) δppm: 1.41(d,J=6.7Hz,3H), 1.95(dd,J=16.1,5.5Hz,1H), 2.50(dd,J=16.1,7.6,3.0Hz,1H), 2.97(qui,J=3.0Hz,1H), 3.18(dd,J=12.8,4.0Hz,1H), 3.28(m,1H), 3.73(dd,J=12.8,10.4Hz,1H), 4.52(sep,J=4.0Hz,1H), 5.21(m,1H), 5.31(dd,J=11.3,5.5Hz,1H), 5.78~5.90(m,3H), 6.35(s,1H)	(CD3OD,125MHz) δppm: 20.1(q), 36.0(t), 40.0(t), 56.0(d), 57.2(d), 70.3(d), 72.7(d), 103.5(d), 108.6(s), 115.9(s), 127.4(d), 129.3(d), 130.7(d), 139.0(s), 139.1(d), 159.0(s), 162.8(s), 171.2(s)

【0069】

【表5】表2のつづき

化合物番号	1H-NMR	13C-NMR
7	(CD3OD,500MHz) δppm: 1.19(m,1H), 1.35(d,J=6.7Hz,3H), 1.85(dd,J=15.5,5.2Hz,1H), 1.95(m,1H), 2.01(m,1H), 2.16(m,1H), 2.27(dd,J=15.5,6.7Hz,1H), 2.50(dt,J=9.1,3.0Hz,1H), 2.85(qu,J=3.0Hz,1H), 3.23(dd,J=12.5,5.5Hz,1H), 3.63(dd,J=12.5,9.4Hz,1H), 4.33(qu,J=5.5Hz,1H), 5.07(d'qui,J=6.7,2.4Hz,1H), 5.28(dd,J=15.5,5.5Hz,1H), 5.38(ddd,J=15.5,12.5,5.5,1H), 6.32(s,1H)	(CD3OD,125MHz) δppm: 20.2(q), 29.5(t), 31.3(t), 37.0(t), 40.2(t), 58.3(d), 59.6(d), 70.9(d), 71.8(d), 103.4(d), 109.3(s), 115.9(d), 129.1(d), 133.2(d), 140.0(d), 159.2(s), 163.0(s), 171.8(s)
8	(CD3OD,500MHz) δppm: 1.27(m,1H), 1.35(d,J=6.1Hz,3H), 2.02(m,1H), 2.03(m,1H), 2.05(m,1H), 2.17(m,1H), 2.20(m,1H), 2.86(dd,J=5.8,3.0Hz,1H), 2.92(dt,J=8.5,3.0Hz,1H), 3.25(dd,J=12.8,5.5Hz,1H), 3.30(dd,J=12.8,9.8Hz,1H), 4.43(m,1H), 4.93(d'sxt,J=6.1,1.8Hz,1H), 5.37(dt,J=15.5,4.0Hz,1H), 5.64(dt,J=5.5,6.1Hz,1H), 6.41(s,1H)	(CD3OD,125MHz) δppm: 20.4(q), 28.8(t), 31.2(c), 36.8(t), 39.7(t), 56.8(d), 57.6(d), 69.5(d), 70.6(d), 103.3(d), 114.7(s), 114.9(s), 129.7(d), 133.4(d), 138.5(s), 157.3(s), 158.2(s), 166.5(s)
9	(CD3OD,500MHz) δppm: 1.11(m,1H), 1.43(m,1H), 1.45(d,J=6.4Hz,3H), 1.48(m,1H), 1.52(m,1H), 1.57(m,1H), 1.74(ddd,J=5.5,7.3,2.4Hz,1H), 2.09(d'qui,J=14.3,2.4Hz,1H), 2.36(ddd,J=15.5,7.3,2.4Hz,1H), 2.71(dt,J=9.4,2.4Hz,1H), 3.03(dt,J=7.3,2.4Hz,1H), 3.21(dd,J=7.3,1.8Hz,2H), 3.88(m,1H), 5.20(d'qui,J=6.4,2.4Hz,1H), 6.38(s,1H)	(CD3OD,125MHz) δppm: 20.0(q), 25.2(t), 25.8(t), 32.2(t), 36.8(t), 38.0(t), 39.9(t), 58.2(d), 60.5(d), 71.4(d), 72.8(d), 103.0(d), 112.3(s), 115.3(s), 139.7(s), 158.0(s), 160.1(s), 171.1(s)
10	(CD3OD,500MHz) δppm: 1.28(m,1H), 1.35(m,2H), 1.40(d,J=6.1Hz,3H), 1.50(m,1H), 1.57(m,1H), 1.94(m,1H), 2.37(m,1H), 2.81(dt,J=7.3,2.4Hz,1H), 2.88(dt,J=7.3,2.4Hz,1H), 2.98(dd,J=13.4,5.6Hz,1H), 3.15(dd,J=13.4,7.2Hz,1H), 3.82(qui,J=6.1Hz,1H), 5.12(d'sxt,J=6.1,2.4Hz,1H), 6.39(s,1H)	(CD3OD,125MHz) δppm: 20.5(q), 23.5(t), 24.6(t), 30.2(t), 35.1(t), 37.8(t), 39.2(t), 57.1(d), 59.1(d), 72.2(d), 72.3(d), 102.9(d), 114.6(s), 115.9(s), 138.5(s), 156.6(s), 156.8(s), 169.8(s)
11	(CDCI3,500MHz) δppm: 1.50(d,J=6.7Hz,3H), 1.61(dd,J=14.8,8.6,3.7Hz,1H), 2.40(dt,J=4.6,3.7Hz,1H), 3.02(dt,J=8.6,1.8Hz,1H), 3.40(br,t,J=8Hz,1H), 3.75(d,J=15.9Hz,1H), 3.83(s,3H), 3.89(s,3H), 3.95(d,J=15.9Hz,1H), 5.35(dd,J=6.7,3.7Hz,1H), 5.69(dd,J=10.4,4.3Hz,1H), 6.07(d,J=15.9Hz,1H), 6.12(t,J=10.4Hz,1H), 6.45(s,1H), 7.48(dd,J=15.9,10.4Hz,1H)	(CDCI3,125MHz) δppm: 18.6(q), 37.3(t), 45.2(t), 55.5(d), 55.6(d), 56.3(q), 56.4(q), 70.2(d), 95.5(d), 115.5(s), 117.9(s), 130.2(d), 131.0(d), 132.4(s), 135.6(d), 138.6(d), 156.3(s), 156.8(s), 166.0(s), 196.4(s)

〔0070〕

【表6】表2のつづき

化合物番号	1H-NMR	13C-NMR
12	(CD3OD, 500MHz) δppm: 1.42(d, J=6.4Hz, 3H), 1.89(ddd, J=15.2, 9.1, 3.6Hz, 1H), 2.03(dd, J=15.2, 7.0Hz, 1H), 3.66(d, J=16.2Hz, 1H), 3.99(dd, J=9.1, 5.8Hz, 1H), 4.21(d, J=16.2Hz, 1H), 5.12(dd, J=0.0, 5.8Hz, 1H), 5.38(dq, J=6.4, 3.6Hz, 1H), 5.78(t, J=0.0Hz, 1H), 5.95(d, J=16.1Hz, 1H), 6.17(t, J=11.0Hz, 1H), 6.46(s, 1H), 7.21(dd, J=16.1, 11.0Hz, 1H),	(CD3OD, 125MHz) δppm: 19.3(q), 38.2(t), 45.7(v), 60.6(d), 70.9(d), 72.6(d), 103.9(d), 114.3(s), 116.3(s), 130.8(d), 132.6(d), 134.6(s), 138.1(d), 141.1(d), 156.9(s), 157.0(s), 168.1(s), 199.8(s)
13	(CD3OD, 500MHz) δppm: 1.46(d, J=6.1Hz, 3H), 1.96(ddd, J=14.0, 10.4, 3.0Hz, 1H), 2.12(dd, J=14.0, 9.8, 3.0Hz, 1H), 3.76(d, J=15.3Hz, 1H), 3.88(dt, J=9.8, 3.0Hz, 1H), 4.73(d, J=15.3Hz, 1H), 5.00(dd, J=9.8, 3.0Hz, 1H), 5.27(m, 1H), 6.00(d, J=15.9Hz, 1H), 6.02(t, J=9.8Hz, 1H), 6.14(t, J=9.8Hz, 1H), 6.46(s, 1H), 7.18(dd, J=15.9, 9.8Hz, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δppm: 20.8(q), 40.6(t), 44.5(v), 44.5(v), 71.0(d), 72.1(q), 104.1(d), 113.8(s), 115.7(s), 127.6(d), 131.7(d), 135.4(s), 138.6(d), 139.1(d), 157.8(s), 158.6(s), 168.5(s), 198.7(s)
14	(CD3OD, 500MHz) δppm: 1.42(d, J=6.7Hz, 3H), 1.87(ddd, J=15.3, 9.2, 3.7Hz, 1H), 1.95(dd, J=15.3, 6.7Hz, 1H), 3.63(d, J=15.9Hz, 1H), 3.80(m, 1H), 4.18(d, J=15.9Hz, 1H), 4.78(dd, J=8.5, 6.1Hz, 1H), 5.40(m, 1H), 5.73(dd, J=11.0, 8.5Hz, 1H), 5.90(d, J=15.9Hz, 1H), 6.14(t, J=11.0Hz, 1H), 6.41(s, 1H), 7.30(dd, J=15.9, 11.0Hz, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δppm: 19.4(q), 37.8(t), 45.8(t), 71.2(d), 71.9(d), 72.0(d), 103.8(d), 114.3(s), 116.6(s), 130.0(d), 131.5(d), 134.7(s), 142.4(d), 142.9(d), 156.7(s), 156.9(s), 168.4(s), 200.2(s)
15	(CD3OD, 500MHz) δppm: 1.44(d, J=6.1Hz, 3H), 1.83(ddd, J=14.6, 9.8, 3.0Hz, 1H), 2.10(dd, J=14.6, 9.8, 3.0Hz, 1H), 3.64(dt, J=9.8, 3.0Hz, 1H), 3.87(dJ=15.9Hz, 1H), 4.53(d, J=15.9Hz, 1H), 4.56(m, 1H), 5.45(m, 1H), 5.94(dd, J=10.4, 7.3Hz, 1H), 5.96(d, J=15.9Hz, 1H), 6.12(t, J=10.4Hz, 1H), 6.44(s, 1H), 7.36(dd, J=15.9, 10.4Hz, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δppm: 21.0(q), 39.3(t), 44.5(t), 69.5(d), 71.2(d), 72.7(d), 104.0(d), 113.0(s), 115.9(s), 127.2(d), 131.3(d), 135.8(s), 140.6(d), 143.7(d), 158.2(s), 158.9(s), 168.7(s), 199.5(s)
16	(CD3OD, 500MHz) δppm: 1.29(d, J=6.1Hz, 3H), 1.70(dd, J=11.6, 10.4, 2.4Hz, 1H), 2.17(dt, J=11.6, 6.1Hz, 1H), 4.01(d, J=18.9Hz, 1H), 4.05(m, 1H), 4.34(d, J=18.9Hz, 1H), 5.01(m, 1H), 5.46(d, J=9.8Hz, 1H), 5.82(dd, J=15.3, 9.8Hz, 1H), 6.02(t, J=11.0Hz, 1H), 6.10(dd, J=15.3, 11.0Hz, 1H), 6.30(t, J=11.0Hz, 1H), 6.45(s, 1H)	(CD3OD, 125MHz) δppm: 20.6(q), 42.3(t), 42.4(t), 62.9(d), 70.4(d), 71.5(d), 103.8(d), 115.0(s), 116.4(s), 126.2(d), 127.6(d), 133.4(s), 134.8(d), 140.8(d), 156.5(s), 156.6(s), 169.4(s), 201.0(s)

【0071】

【表7】表2のつづき

化合物番号	1H-NMR	13C-NMR
17	(CD3OD,500MHz) δppm: 1.38(s,3H), 1.39(s,3H), 1.46(d,J=6.4Hz,3H), 1.87(dd,J=16.1,9.1Hz,1H), 2.08(dd,J=16.1,5.8,1.8Hz,1H), 3.73(dd,J=9.1,5.8Hz,1H), 3.85(d,J=16.4Hz,1H), 4.38(d,J=6.4Hz,1H), 4.7(t,J=9.1Hz,1H), 5.66(m,1H), 5.78(dd,J=11.39,11Hz,1H), 6.03(d,J=6.1Hz,1H), 6.32(t,J=11.3Hz,1H), 6.47(s,1H), 7.83(dd,J=6.1,11.3Hz,1H)	(CD3OD,125MHz) δppm: 21.8(q), 27.2(q), 27.3(q), 34.5(t), 45.9(t), 70.3(d), 75.9(d), 103.8(d), 110.1(s), 111.0(s), 116.2(s), 130.3(d), 131.3(d), 136.6(s), 138.7(d), 142.2(d), 158.8(s), 160.3(s), 169.1(s), 200.4(s)
18	(CDCl <sub>3</sub> /CD3OD,500MHz) δppm: 1.52(d,J=6.4Hz,3H), 2.02(dd,J=4.9,9.1,4.0Hz,1H), 2.09(dd,J=4.9,6.4Hz,1H), 3.79(d,J=16.1Hz,1H), 4.20(d,J=6.1Hz,1H), 5.23(dd,J=10.0,5.8Hz,1H), 5.34(dt,J=6.4,4.0Hz,1H), 5.39(dd,J=8.8,5.8Hz,1H), 5.37(c,L=10.0Hz,1H), 6.00(d,J=6.1,11.0Hz,1H), 6.16(t,J=11.0Hz,1H), 6.48(s,1H), 7.18(dd,J=16.1,11.0Hz,1H), 8.02(s,1H)	(CDCl <sub>3</sub> /CD3OD,125MHz) δppm: 19.0(q), 35.3(t), 45.4(t), 56.8(d), 70.0(d), 73.3(d), 103.6(d), 114.0(s), 115.1(s), 130.9(d), 133.1(d), 133.6(s), 135.6(d), 139.2(d), 156.3(s), 156.4(s), 160.6(d), 167.3(s), 198.8(s)
19	(DMSO-d <sub>6</sub> ,500MHz) δppm: 1.25(d,J=6.1Hz,3H), 1.74(dd,J=15.3,10.4,7.9Hz,1H), 2.01(d,J=15.3Hz,1H), 2.49(dd,J=14.6,3.0Hz,1H), 3.11(dd,J=4.6,12.2Hz,1H), 3.81(t,J=7.9Hz,1H), 3.92(d,J=17.7Hz,1H), 3.97(d,J=17.7Hz,1H), 4.39(dd,J=7.9,1.8Hz,1H), 4.61(d,J=12.2Hz,1H), 5.11(m,1H), 5.83(dt,J=10.4,1.8Hz,1H), 5.91(dt,J=10.4,1.8Hz,1H), 6.47(s,1H), 9.97(br,s,1H), 10.35(br,s,1H)	(DMSO-d <sub>6</sub> ,125MHz) δppm: 20.8(q), 37.8(t), 43.3(t), 46.0(t), 56.1(d), 69.2(d), 72.1(d), 72.6(d), 102.2(d), 112.3(s), 115.0(s), 126.9(d), 131.6(d), 131.8(s), 154.0(s), 154.7(s), 167.2(s), 202.8(s)
20	(CDCl <sub>3</sub> ,500MHz) δppm: 1.40(d,J=6.4Hz,3H), 1.77(dd,J=10.4,7.9,1.5Hz,1H), 1.91(m,1H), 2.04(m,1H), 2.13(m,1H), 2.23(dd,J=12.5,7.3Hz,1H), 2.42(dd,J=14.6,4.9Hz,1H), 2.73(dd,J=15.5,11.3Hz,1H), 3.04(dd,J=14.6,4.6Hz,1H), 3.30(t,J=10.0Hz,1H), 3.91(dd,J=10.4,7.9,1.5Hz,1H), 4.13(d,J=8.3Hz,1H), 4.42(s,t,J=4.6Hz,1H), 4.94(d,J=18.3Hz,1H), 5.26(s,t,J=6.4Hz,1H), 6.60(s,1H), 11.9(br,s,1H)	(CDCl <sub>3</sub> ,125MHz) δppm: 20.8(q), 27.2(t), 28.7(t), 42.5(t), 45.3(t), 50.4(t), 56.6(d), 72.3(d), 78.1(d), 81.3(d), 103.6(g), 107.4(s), 114.5(s), 135.8(s), 156.3(s), 164.1(s), 170.3(s), 206.1(s)
21	(CDCl <sub>3</sub> /CD3OD,500MHz) δppm: 1.20(d,J=6.1Hz,3H), 1.41(m,1H), 1.86(m,1H), 1.70(m,1H), 1.75(m,1H), 2.13(d,J=13.4Hz,1H), 2.16(dd,J=11.0,2.7Hz,1H), 2.22(m,1H), 2.57(t,J=11.0Hz,1H), 3.28(t,J=9.8Hz,1H), 3.42(dd,J=11.6,9.8,4.6Hz,1H), 3.51(dt,J=11.0,2.7Hz,1H), 4.13(d,J=19.2Hz,1H), 5.05(d,sxt,J=6.1,1.8Hz,1H), 5.31(br,d,J=19.2Hz,1H), 6.33(s,1H)	(CDCl <sub>3</sub> /CD3OD,125MHz) δppm: 20.8(q), 32.4(t), 34.1(t), 37.9(t), 47.3(t), 47.9(t), 57.5(d), 74.4(d), 76.2(d), 81.7(d), 102.8(d), 107.6(s), 115.0(s), 134.7(s), 157.3(s), 161.3(s), 170.5(s), 207.0(s)

【0072】

【表8】表2のつづき

化合物番号	1H-NMR	13C-NMR
22	(CDCl <sub>3</sub> /CD3OD, 500MHz) δppm: 1.30(d, J=6.1Hz, 3H), 1.75(dd, J=11.6, 5.5Hz, 1H), 1.80(d, J=14.6Hz, 1H), 1.99(m, 1H), 2.18(m, 2H), 2.54(br. s, 2H), 2.85(br. s, 2H), 3.82(m, 1H), 3.91(br. s, 1H), 4.42(br. s, 1H), 5.15(m, 1H), 6.43(s, 1H)	(CDCl <sub>3</sub> /CD3OD, 125MHz) δppm: 21.4(q), 27.0(t), 28.7(t), 35.8(t), 46.9(t), 46.9(t), 58.6(d), 68.2(d), 74.1(d), 77.0(d), 103.2(d), 107.0(s), 115.5(s), 134.8(s), 158.0(s), 162.1(s), 170.9(s), 205.0(s)
23	(DMSO-d <sub>6</sub> , 500MHz) δppm: 1.26(d, J=6.7Hz, 3H), 1.44(ddd, J=14.6, 7.9, 3.0Hz, 1H), 2.16(d, J=12.8Hz, 1H), 2.37(dd, J=14.6, 5.5Hz, 1H), 2.76(dd, J=14.6, 4.9Hz, 1H), 3.20(m, 1H), 3.71(d, J=18.3Hz, 1H), 3.90(d, J=18.3Hz, 1H), 4.21(dt, J=9.8, 1.8Hz, 1H), 4.88(d, J=6.7Hz, 1H), 5.01(br.s, 1H), 5.20(sep, J=3.7Hz, 1H), 5.89(dt, J=6.1, 1.8Hz, 1H), 6.00(dt, J=6.1, 1.8Hz, 1H), 6.50(s, 1H), 9.97(s, 1H), 10.47(br.s, 1H)	(DMSO-d <sub>6</sub> , 125MHz) δppm: 19.2(q), 37.6(t), 45.1(t), 48.3(t), 69.7(d), 70.3(d), 83.3(d), 88.4(d), 102.4(d), 111.7(s), 115.3(s), 129.3(d), 130.0(d), 130.2(s), 154.4(s), 154.7(s), 166.4(s), 203.8(s)

【0073】

## 実験例12 毛乳頭細胞におけるWNT mRNAの発現

ヒト毛乳頭細胞は、東洋紡から購入し、12%FBSを添加したMEM（ギブコ）を用いて培養した。ヒト毛包角化細胞は、荒瀬らの方法（J.Dermatol.Sci.2,66-70(1991)）に従って、抜毛髪から分離しKGM-2（三光純薬）を用いて培養した。

## 【0074】

継代5回目の毛乳頭細胞及び継代2回目の毛包角化細胞を、 $2 \times 10^6$  cells/we 11となるように10cmシャーレに播種し、二晩培養した。培地を除去し、細胞をPBS（-）で洗浄後、TRIzol試薬（インビトロジエン）を用いてtotal RNAを抽出した。各total RNA 50ng、WNT-5A又は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 特異的なプライマー (WNT-5A forward : AATGTCTTCCAAGTTCTTCCTAGTGGC (配列番号8) 、 WNT-5A reverse : GATGTCGGAATTGATACTGGCA (配列番号9) 、 GAPDH forward : ACCACAGTCCATGCCATCAC (配列番号10) 、 GAPDH reverse : TCCACCACCCCTGTTGCTGTA (配列番号11) ) 各0.4 μM、及びSUPERSCRIPT One-Step RT-PCR with PLATINUM Taq (インビトロジエン) を用いて、SUPERSCRIPT One-Step RT-PCR with PLATINUM Taq添付のプロトコールに従い、全量25 μl の反応系で、50°Cで30分間first strand合成を行った後、94°Cで2分間加熱、その後、94°Cで30秒、55°Cで30秒、72°Cで30秒を23または20サイクル繰り返し、各cDNA断片を増幅した。

## 【0075】

この反応液を、1. 5%アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムプロマイトにて染色した。結果を図1に示す。

## 【0076】

毛乳頭細胞 (DPC) 由来のRNAを用いた場合は、WNT-5A特異的なプライマーを用いた23サイクルのPCRにおいて、顕著なcDNA断片の増幅が認められた。一方、毛包角化細胞 (HFC) 由来のRNAを用いた場合は、同条件において、増幅産物は認められなかった。

## 【0077】

## 実験例13 WNT-5A mRNA量減少活性の測定

ヒト毛乳頭細胞は、東洋紡から購入し、12%FBSを添加したMEM（ギブコ）を用

いて培養した。

## 【0078】

継代5回目の毛乳頭細胞を、1.  $6 \times 10^5$  cells/wellとなるように12穴プレートに播種し、一晩培養した。化合物無添加培地、または化合物1、2、3、4、5、7、9又は24添加培地と交換し、更に24時間、培養を行った。培養終了時、培地を除去し、細胞をPBS（-）で洗浄後、TRIzol試薬（インビトロジエン）を用いてtotal RNAを抽出した。各total RNA 50ng、WNT-5A又はGAPDH特異的なプライマー（WNT-5A forward : AATGTCTCCAAGTTCTCCTAGTGGC（配列番号8）、WNT-5A reverse : GATGTCGGAATTGATACTGGCA（配列番号9）、GAPDH forward : ACCACAGTCCATGCCATCAC（配列番号10）、GAPDH reverse : TCCACCACCCCTGTTGCTGTA（配列番号11））各0.4 μM、及びSUPERSCRIPT One-Step RT-PCR with PLATINUM Taq（インビトロジエン）を用いて、SUPERSCRIPT One-Step RT-PCR with PLATINUM Taq添付のプロトコールに従い、全量25 μlの反応系で、50°Cで30分間first strand合成を行った後、94°Cで2分間加熱、その後、94°Cで30秒、55°Cで30秒、72°Cで30秒を23または20サイクル繰り返し、WNT-5AまたはGAPDHのcDNA断片を増幅した。

## 【0079】

この反応液を、1. 5%アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムプロマイドにて染色した。結果を図2に示す。

## 【0080】

WNT-5A特異的なプライマーを用いた23サイクルのPCRにおいて、化合物無添加で培養した場合と比較して、化合物を添加した培養では、WNT-5A cDNA断片の増幅が顕著に減少した。

## 【0081】

一方、GAPDH特異的なプライマーを用いた20サイクルのPCRにおいて、GAPDH cDNA断片の増幅は、化合物の添加の有無に関わらず、変動が認められなかった。

## 【0082】

## 実験例14 毛乳頭細胞増殖促進活性試験

ヒト毛乳頭細胞は、東洋紡から購入し、12%FBSを添加したMEM（ギブコ）を用

いて培養した。

## 【0083】

継代5回目の毛乳頭細胞を、 $1.5 \times 10^4$  cells/wellとなるようにスフェロイド培養用96穴プレートに播種し、一晩培養した。化合物無添加培地、または化合物1、2、3、4、5、7、9又は24添加培地と交換し、更に72時間培養を行った。培養終了時の細胞数をCell counting kit(和光純薬)を用いて測定した。即ち、培養終了5時間前に培地の1/10量のWST-1試薬を培地に添加し、培養終了時、培地の吸光度(O. D. 450nm/620nm)を測定した。細胞数と吸光度は、細胞数 $0.25 \sim 4 \times 10^4$  cells/wellの範囲で正の相関関係が認められた。

## 【0084】

その結果、WNT-5A mRNA量減少活性を有する化合物が、毛乳頭細胞の増殖を促進する活性を有することが明らかになった(図3)。図中の値は、対照群6well、化合物添加群3wellの平均値である。対照群と化合物添加群との比較にはスクレーデントのt検定を用いた。

\* :  $P < 0.05$ 、 \*\* :  $P < 0.01$ 、 \*\*\* :  $P < 0.001$

上記実験例により、WNT-5Aがヒト毛乳頭細胞に発現していること、ヒト毛乳頭細胞のWNT-5A mRNA量が本発明に係る化合物により減少すること、更に、WNT-5A mRNA量減少活性を有する化合物が、毛乳頭細胞の増殖を促進する活性を有することが示された。

## 【0085】

## 【発明の効果】

WNT-5A機能阻害剤、例えば、WNT-5A mRNA量を減少させる活性を有する化合物又はその医薬上許容される塩は、毛乳頭細胞増殖活性を有し、新規な作用機序による発毛剤／育毛剤として有用である。

## 【0086】

本発明は、WNT-5Aの機能を阻害する化合物が、脱毛症の改善剤もしくは予防剤になるという、今までにない全く新しい概念を提供するものであり、WNT-5Aの機能を阻害する化合物をスクリーニングは、新規な発毛剤／育毛剤の開発に有用である。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】毛乳頭細胞にWNT-5A mRNAが発現していることを示す図である。

【図2】被験化合物が毛乳頭細胞においてWNT-5A mRNA量を減少させることを示す図である。

【図3】被験化合物が毛乳頭細胞の増殖促進活性を有することを示すグラフである。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110>TAISHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120>HAIR GROWTH PREPARATION

<130>00TS-P3320

<160>11

<210>1

<211>365

<212>PROTEIN

<213>HOMO SAPIENS

<400>1

Met Ala Gly Ser Ala Met Ser Ser Lys Phe Phe Leu Val Ala Leu

5	10	15
---	----	----

Ala Ile Phe Phe Ser Phe Ala Gln Val Val Ile Glu Ala Asn Ser

20	25	30
----	----	----

Trp Trp Ser Leu Gly Met Asn Asn Pro Val Gln Met Ser Glu Val

35	40	45
----	----	----

Tyr Ile Ile Gly Ala Gln Pro Leu Cys Ser Gln Leu Ala Gly Leu

50	55	60
----	----	----

Ser Gln Gly Gln Lys Lys Leu Cys His Leu Tyr Gln Asp His Met

65	70	75
----	----	----

Gln Tyr Ile Gly Glu Gly Ala Lys Thr Gly Ile Lys Glu Cys Gln

80	85	90
----	----	----

Tyr Gln Phe Arg His Arg Arg Trp Asn Cys Ser Thr Val Asp Asn  
                  95                     100                 105  
 Thr Ser Val Phe Gly Arg Val Met Gln Ile Gly Ser Arg Glu Thr  
                  110                 115                 120  
 Ala Phe Thr Tyr Ala Val Ser Ala Ala Gly Val Val Asn Ala Met  
                  125                 130                 135  
 Ser Arg Ala Cys Arg Glu Gly Glu Leu Ser Thr Cys Gly Cys Ser  
                  140                 145                 150  
 Arg Ala Ala Arg Pro Lys Asp Leu Pro Arg Asp Trp Leu Trp Gly  
                  155                 160                 165  
 Gly Cys Gly Asp Asn Ile Asp Tyr Gly Tyr Arg Phe Ala Lys Glu  
                  170                 175                 180  
 Phe Val Asp Ala Arg Glu Arg Ile His Ala Lys Gly Ser  
                  185                 190                 195  
 Tyr Glu Ser Ala Arg Ile Leu Met Asn Leu His Asn Asn Glu Ala  
                  200                 205                 210  
 Gly Arg Arg Thr Val Tyr Asn Leu Ala Asp Val Ala Cys Lys Cys  
                  215                 220                 225  
 His Gly Val Ser Gly Ser Cys Ser Leu Lys Thr Cys Trp Leu Gln  
                  230                 235                 240  
 Leu Ala Asp Phe Arg Lys Val Gly Asp Ala Leu Lys Glu Lys Tyr  
                  245                 250                 255  
 Asp Ser Ala Ala Ala Met Arg Leu Asn Ser Arg Gly Lys Leu Val  
                  260                 265                 270  
 Gln Val Asn Ser Arg Phe Asn Ser Pro Thr Thr Gln Asp Leu Val  
                  275                 280                 285  
 Tyr Ile Asp Pro Ser Pro Asp Tyr Cys Val Arg Asn Glu Ser Thr  
                  290                 295                 300  
 Gly Ser Leu Gly Thr Gln Gly Arg Leu Cys Asn Lys Thr Ser Glu

305	310	315
Gly Met Asp Gly Cys Glu Leu Met Cys Cys Gly Arg Gly Tyr Asp		
320	325	330
Gln Phe Lys Thr Val Gln Thr Glu Arg Cys His Cys Lys Phe His		
335	340	345
Trp Cys Cys Tyr Val Lys Cys Lys Cys Thr Glu Ile Val Asp		
350	355	360
Gln Phe Val Cys Lys		
365		

&lt;210&gt;2

&lt;211&gt;4428

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;HOMO SAPIENS

&lt;400&gt;2

ttaaggaaat	ccgggctgct	cttccccatc	tggaagtggc	tttccccaca	tcggctcgta	60
aactgattat	gaaacatacg	atgttaattc	ggagctgcat	ttcccagctg	ggcactctcg	120
cgcgctggtc	cccggggcct	cgccccccac	cccctgccct	tccctcccgc	gtcctgcccc	180
catcctccac	cccccgcgct	ggccaccccg	cctccttggc	agcctctggc	ggcagcgcgc	240
tccactcgcc	tcccgtgctc	ctctcgccca	tggaattaat	tctggctcca	cttgggtgctc	300
ggcccaggtt	ggggagagga	cggagggtgg	ccgcagcggg	ttcctgagtg	aattaccag	360
gagggactga	gcacagcacc	aactagagag	gggtcagggg	gtgcgggact	cgagcgagca	420
ggaaggagggc	agcgcctggc	accagggctt	tgactcaaca	gaattgagac	acgtttgtaa	480
tcgctggcgt	gccccgcgca	caggatccca	gcgaaaatca	gatttcctgg	tgaggttgcg	540
tgggtggatt	aatttggaaa	aagaaaactgc	ctatatcttgc	ccatcaaaaa	actcacggag	600
gagaagcgca	gtcaatcaac	agtaaactta	agagacccccc	gatgctcccc	tggtttaact	660
tgtatgcttgc	aaaattatct	gagagggaat	aaacatcttt	tccttcttcc	ctctccagaa	720
gtccatttggaa	atattaagcc	caggagttgc	tttggggatg	gctggaagtg	caatgtcttc	780
caagttcttc	ctagttggcatt	tggccatatt	tttctccatc	gcccgaggatg	taattgaagc	840
caattttgg	tggtcgctag	gtatgaataa	ccctgttcag	atgtcagaag	tatataattat	900

aggagcacag cctctctgca gccaaactggc aggacttct caaggacaga agaaaactgtg 960  
 ccacttgtat caggaccaca tgcagtacat cggagaaggc gcgaagacag gcatcaaaga 1020  
 atgccagtat caattccgac atcgacggtg gaactgcagc actgtggata acacctctgt 1080  
 ttttggcagg gtgatgcaga taggcagccg cgagacggcc ttcacatacg ccgtgagcgc 1140  
 agcaggggtg gtgaacgcca tgagccggc gtgccgcgag ggcgagctgt ccacctgcgg 1200  
 ctgcagccgc gccgcgcgccc ccaaggacct gccgcggac tggctctgg gcggctgcgg 1260  
 cgacaacatc gactatggct accgccttgc caaggagttc gtggacgccc gcgagcggga 1320  
 gcgcatccac gccaagggct cctacgagag tgctcgcatc ctcataacc tgacacaacaa 1380  
 cgaggccggc cgcaaggacgg tgtacaacct ggctgatgtg gcctgcaagt gccatggggt 1440  
 gtccggctca tgttagcctga agacatgctg gctgcagctg gcagacttcc gcaaggtggg 1500  
 ttagccctg aaggagaagt acgacagcgc ggcggccatg cggctcaaca gccggggcaa 1560  
 gttggtagag gtcaacagcc gcttcaactc gcccaccaca caagacctgg tctacatcga 1620  
 cccccagccct gactactgcg tgcgcaatga gagcaccggc tcgctggca cgcagggccg 1680  
 cctgtgcaac aagacgtcgg agggcatgga tggctgcgag ctcatagtgct gcggccgtgg 1740  
 gtacgaccag ttcaagaccg tgcaagacgga ggcgtgccac tgcaagttcc actggtgctg 1800  
 ctacgtcaag tgcaagaagt gcacggagat cgtggaccag tttgtgtca agtagtgggt 1860  
 gccacccagc actcagcccc gctcccgaga cccgcttatt tatagaaagt acagtgattc 1920  
 tggttttgg ttttagaaa tatttttat tttcccaa gaattgcaac cggaaccatt 1980  
 tttttcctg ttaccatcta agaactctgt ggtttattat taatattata attattattt 2040  
 ggcaataatg ggggtggaa ccacgaaaaa tattttttt gtggatctt gaaaaggtaa 2100  
 tacaagactt ctttggata gtatagaatg aagggggaaa taacacatac cctaacttag 2160  
 ctgtgtggga catggtacac atccagaagg taaagaaata cattttctt ttctcaaata 2220  
 tgccatcata tggatgggt aggtccagt tgaaagaggg tggtagaaat ctattcacaa 2280  
 ttcagcttct atgaccaaaa tgagttgtaa attctctggt gcaagataaa aggtcttggg 2340  
 aaaacaaaaac aaaacaaaaac aaacccctt ccccgagcag ggctgctagc ttgctttctg 2400  
 cattttcaaa atgataattt acaatggaag gacaagaatg tcataattctc aaggaaaaaa 2460  
 ggtatatcac atgtctcatt ctcctcaaat attccatttg cagacagacc gtcataattct 2520  
 aatagctcat gaaatttggg cagcagggag gaaagtcccc agaaattaaa aaatttaaaa 2580  
 ctcttatgtc aagatgttga tttgaagctg ttataagaat tggattcca gatttgtaaa 2640

aagaccccca atgattctgg acactagatt ttttgggg ggagggttgc ttgaacataa 2700  
 atgaaatatc ctgtatccc tttaggatac ttggtagta aattataata gtagaaataa 2760  
 tacatgaatc ccattcacag gtttctcagc ccaagcaaca aggttaattgc gtgccattca 2820  
 gcactgcacc agagcagaca acctatttga ggaaaaacag tgaaaatccac cttcctcttc 2880  
 acacitgagcc ctctctgatt cctccgtgtt gtgatgtgat gctggccacg tttccaaacg 2940  
 gcagctccac tgggtccccct ttgggtttag gacaggaaat gaaacattag gagctctgct 3000  
 tggaaaacag ttcactactt agggattttt gtttcctaaa acttttattt tgaggagcag 3060  
 tagtttcta tgggttaatg acagaacttg gctaattgaa ttcacagagg tggtgcagcg 3120  
 tatactgtt atgatccctgt gtttagatta tccactcatg cttctcctat tgtactgcag 3180  
 gtgtaccta aaactgttcc cagtgtactt gaacagttgc atttataagg gggaaatgt 3240  
 ggttaatgg tgcctgatat ctcaaagtct tttgtacata acatataat atatatacat 3300  
 atatataaat ataaatataa atatatctca ttgcagccag tgattnagat ttacagctta 3360  
 ctctgggtt atctctctgt ctagagcattt gttgtccttc actgcagtcc agttgggatt 3420  
 attccaaaag tttttgagt tttagcttg ggctgtggcc ccgctgtgat cataccctga 3480  
 gcacgacgaa gcaacctcgt ttctgaggaa gaagcttgag ttctgactca ctgaaatgcg 3540  
 tggtgggtt aagatatctt ttttctttt ctgcctcacc ccttgcctc caacctccat 3600  
 ttctgttcac ttgtggaga gggcattact tggtcgat agacatggac gttaaagagat 3660  
 attcaaaaact cagaagcatc agcaatgttt ctctttctt agttcatttgc gcagaatgga 3720  
 aacccatgcc tattagaaat gacagtactt attaattgag tccctaagga atattcagcc 3780  
 cactacatag atagctttt ttttttttt ttttttttaa taaggacacc tcttccaaa 3840  
 caggccatca aatatgttct tatctcagac ttacgttgc ttaaaagttt ggaaagatac 3900  
 acatctttc atacccccc ttaggagggtt gggcttcat atcacctcag ccaactgtgg 3960  
 ctcttaattt attgcataat gatatccaca tcagccact gtggctttt aatttattgc 4020  
 ataatgatat tcacatcccc tcagttgcag tgaattgtga gcaaaagatc ttgaaagcaa 4080  
 aaagcactaa ttagttaaa atgtcacttt ttgggtttt attataaaaa aaccatgaag 4140  
 tactttttt atttgctaaa tcagattgtt ctttttagt gactcatgtt tatgaagaga 4200  
 gttgagttt acaatcctag cttaaaaag aaactattta atgtaaaata ttctacatgt 4260  
 cattcagata ttatgtatat ctcttagcct ttattctgtt cttaatgt acatattct 4320  
 gtcttgcgtt atttgtatat ttcaactgggtt taaaaaacaac acatcgaaag gcttattcca 4380

aatggaagat agaatataaa ataaaacgtt acttgtaaaa aaaaaaaaa

4428

&lt;210&gt;3

&lt;211&gt;2460

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;HOMO SAPIENS

&lt;400&gt;3

cgtggcacgc gcggaagatt ctcagtgtcc ttacagagtc atcttcctg agccccggaa 60  
 gtgttgaaa acat tagcc cttctttgg gaaactcagt ttctgatcag aattttgtt 120  
 ttaccctggg gttgacagtc tcgccagagg tctcattca tactgtctt tcggatctga 180  
 tcctcttggt aaacaggcgg ggatgtttta ccctacagag ccgatgtatg tgtgagttcg 240  
 ctgtgagttc tttgagtgtc tcaaacttgt gggcccttt ctcgggttgc a ctgggattga 300  
 agagggaga ga gccc aaggt gttccgggc aagcggcggg gttaa gttaa gatgcgactc 360  
 gtgaggctct ccttccgat cccctttgg gacaccctct gcctaccctt accctggagc 420  
 cagggagacc caag tcttgg tgaccggatg gggccctct cagttggcct gggctctggg 480  
 aactggtgga ctctccctgg gggcttcggg ctgggagtgg gttcggtttg tgtggcttcg 540  
 gctctaaca a agatccgc tgtaatccgc cgaatctgtt atcaatttct ctgctgctt 600  
 agccccggcc cacgcgcccc gcccgcgcg aagcttggaa agtgcacgcg gccagcacca 660  
 atctggcccg ctgactcgga aacatgtcgc agcgtgtgt tctatggacg cgtgtgagtg 720  
 t gtaatgtg cacgagtgtg aatgtgtatg atgtgtgtc acgcggcatc ggctgccc 780  
 ggggagagtt gacttgcag cctggctgc gcgagaagca gacttgcag cccactccct 840  
 cccctggagg aaatttgc a ctagggcgg ggtgggag atagccggag cttctctct 900  
 cctagctggg gaaacccag attccattc tccaggatgc gccccccagc tttgcagcgt 960  
 cttgggaca actggcctgg tttggagcc ctgcttagca ggcgcgtggg accacataag 1020  
 cattcccttt tggagaagcc cgaagcgtc caggccaaag gggcggttc acggaagaaa 1080  
 aaccttgcac gccc ttgagc gcata gctt accaggctg cctaggtccc gccttgc 1140  
 ctttacggc acagg tcca agccaggctc ttcccaccgc cttaaaggagg ctcaccc 1200  
 ttttcttcc ttttgc gtttggaggg gtccttcag gggctatggg cgatgcagtg cggcagggtt 1260  
 agacttacgt gtaaggat tttaaaacc cgctccccc acccgaccc gcca cttact 1320

cgctccggccg ccgcctacag gtggagaagt caccagtggg gaggaacggc agcggaaagct 1380  
 tccaaggcca actcctaccc ctgaaattct tcaggaaggg aacttcgcc gctggggggc 1440  
 tcttggcct ggaatcgatg cgcccagctg cggctcgaa gccagcgccct ctggccccgt 1500  
 ctggactcat ctgcaagggc tctggcctcg ccccgaccc ccaccttcg ggactgaccg 1560  
 aaccaagtct gagttggct ggagaggcta gactggaggc agggtggcag agttccaacg 1620  
 acaggctcgc agtgccgcga atggcaaagt gggccacaac cccagatcag gaccagaga 1680  
 aactggagtc tctctctgg cctccatct cctccctccc tggcaactac caggttgtgg 1740  
 ggtgggaggg agagtgaaaa atcaagaatt tgggagaaag ctgtggggag ggcaggaaag 1800  
 ggatccttct ccccgggaa gcgagaccca gactcccttc ttccctctag ggttccatcc 1860  
 cttctcttag tccgtggaag aggccacagg cgacgcggc gagggtggca ctctttcca 1920  
 gttcccttgg ttgggagacc cgacctctct ctcattatc ccctagggcc cccatctcct 1980  
 tctccctcc ctagtctggc tgaagaacgt ccttaaggaa atccggcgtg ctcttccca 2040  
 tctggaagtg gctttccca catcgctcg taaaactgatt atgaaacata cgatgttaat 2100  
 tcggagctgc atttcccagc tggcactct cgcgcgtgg tccccggggc ctcgcccccc 2160  
 accccctgcc cttccctccc gcgtcctgcc cccatcctcc acccccccgcg ctggccaccc 2220  
 cgcctccctg gcagcctctg gcggcagcgc gtcactcg ctcctcgcc tcctctcgcc 2280  
 catggaatta attctggctc cacttggc tcggccagg ttggtagag gacggagggt 2340  
 gccccacagcg gttccctgag tgaattaccc aggaggact gagcacagca ccaactagag 2400  
 gggggccagg ggtgcggga ctcgagcgcag caggaaggag gcagcgcctg gcaccaggc 2460

&lt;210&gt;4

&lt;211&gt;585

&lt;212&gt;PROTEIN

&lt;213&gt;HOMO SAPIENS

&lt;400&gt;4

Met Ala Arg Pro Asp Pro Ser Ala Pro Pro Ser Leu Leu Leu

5

10

15

Leu Leu Ala Gln Leu Val Gly Arg Ala Ala Ala Ser Lys Ala

20

25

30

Pro Val Cys Gln Glu Ile Thr Val Pro Met Cys Arg Gly Ile Gly

35	40	45
Tyr Asn Leu Thr His Met Pro Asn Gln Phe Asn His Asp Thr Gln		
50	55	60
Asp Glu Ala Gly Leu Glu Val His Gln Phe Trp Pro Leu Val Glu		
65	70	75
Ile Gln Cys Ser Pro Asp Leu Arg Phe Phe Leu Cys Thr Met Tyr		
80	85	90
Thr Pro Ile Cys Leu Pro Asp Tyr His Lys Pro Leu Pro Pro Cys		
95	100	105
Arg Ser Val Cys Glu Arg Ala Lys Ala Gly Cys Ser Pro Leu Met		
110	115	120
Arg Gln Tyr Gly Phe Ala Trp Pro Glu Arg Met Ser Cys Asp Arg		
125	130	135
Leu Pro Val Leu Gly Arg Asp Ala Glu Val Leu Cys Met Asp Tyr		
140	145	150
Asn Arg Ser Glu Ala Thr Thr Ala Pro Pro Arg Pro Phe Pro Ala		
155	160	165
Lys Pro Thr Leu Pro Gly Pro Pro Gly Ala Pro Ala Ser Gly Gly		
170	175	180
Glu Cys Pro Ala Gly Gly Pro Phe Val Cys Lys Cys Arg Glu Pro		
185	190	195
Phe Val Pro Ile Leu Lys Glu Ser His Pro Leu Tyr Asn Lys Val		
200	205	210
Arg Thr Gly Gln Val Pro Asn Cys Ala Val Pro Cys Tyr Gln Pro		
215	220	225
Ser Phe Ser Ala Asp Glu Arg Thr Phe Ala Thr Phe Trp Ile Gly		
230	235	240
Leu Trp Ser Val Leu Cys Phe Ile Ser Thr Ser Thr Thr Val Ala		
245	250	255

Thr Phe Leu Ile Asp Met Asp Thr Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro  
 260 265 270  
 Ile Ile Phe Leu Ser Ala Cys Tyr Leu Cys Val Ser Leu Gly Phe  
 275 280 285  
 Leu Val Arg Leu Val Val Gly His Ala Ser Val Ala Cys Ser Arg  
 290 295 300  
 Glu His Asn His Ile His Tyr Glu Thr Thr Gly Pro Ala Leu Cys  
 305 310 315  
 Thr Ile Val Phe Leu Leu Val Tyr Phe Phe Gly Met Ala Ser Ser  
 320 325 330  
 Ile Trp Trp Val Ile Leu Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala Ala Ala  
 335 340 345  
 Met Lys Trp Gly Asn Glu Ala Ile Ala Gly Tyr Gly Gln Tyr Phe  
 350 355 360  
 His Leu Ala Ala Trp Leu Ile Pro Ser Val Lys Ser Ile Thr Ala  
 365 370 375  
 Leu Ala Leu Ser Ser Val Asp Gly Asp Pro Val Ala Gly Ile Cys  
 380 385 390  
 Tyr Val Gly Asn Gln Asn Leu Asn Ser Leu Arg Arg Phe Val Leu  
 395 400 405  
 Gly Pro Leu Val Leu Tyr Leu Leu Val Gly Thr Leu Phe Leu Leu  
 410 415 420  
 Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe Arg Ile Arg Ser Val Ile Lys Gln  
 425 430 435  
 Gly Gly Thr Lys Thr Asp Lys Leu Glu Lys Leu Met Ile Arg Ile  
 440 445 450  
 Gly Ile Phe Thr Leu Leu Tyr Thr Val Pro Ala Ser Ile Val Val  
 455 460 465  
 Ala Cys Tyr Leu Tyr Glu Gln His Tyr Arg Glu Ser Trp Glu Ala

470	475	480
Ala Leu Thr Cys Ala Cys Pro Gly His Asp Thr Gly Gln Pro Arg		
485	490	495
Ala Lys Pro Glu Tyr Trp Val Leu Met Leu Lys Tyr Phe Met Cys		
500	505	510
Leu Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Val Trp Ile Trp Ser Gly Lys		
515	520	525
Thr Val Glu Ser Trp Arg Arg Phe Thr Ser Arg Cys Cys Cys Arg		
530	535	540
Pro Arg Arg Gly His Lys Ser Gly Gly Ala Met Ala Ala Gly Asp		
545	550	555
Tyr Pro Glu Ala Ser Ala Ala Leu Thr Gly Arg Thr Gly Pro Pro		
560	565	570
Gly Pro Ala Ala Thr Tyr His Lys Gln Val Ser Leu Ser His Val		
575	580	585

&lt;210&gt;5

&lt;211&gt;2334

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;HOMO SAPIENS

&lt;400&gt;5

```

acccagggac ggaggaccca ggctggcttg gggactgtct gctttctcg gcgggagccg   60
tggagagtcc tttccctgga atccgagccc taaccgtctc tccccagccc tatccggcga  120
ggagcggagc gctgccagcg gaggcagcgc cttcccgaag cagtttatct ttggacggtt 180
ttcttaaag gaaaaacgaa ccaacaggtt gccagccccg gcccacaca cgagacgccc 240
gagggagaag ccccgccccg gattcctctg cctgtgtcgc tccctcgccg gctgctggag 300
gcgagggag ggagggggcg atggctcggc ctgaccatc cgcgcgcgc tcgctgttc 360
tgctgctcct ggcgcagctg gtggccggg cggccgcgc gtcacaggcc ccggtgtgcc 420
aggaaatcac ggtgcccattg tgccgcggca tcggctacaa cctgacgcac atgcccacc 480
agttaacca cgacacgcag gacgaggcgg gcctggaggt gcaccagttc tggccgctgg 540

```

tggagatcca atgctcgccg gacctgcgtc tttcttatg cactatgtac acggccatct 600  
 gtctgcccga ctaccacaag ccgctgccgc cctgcgcgtc ggtgtgcgag cgcccaagg 660  
 ccggctgctc gccgctgatg cgccagtacg gtttcgcctg gcccggcgc atgagctgcg 720  
 accgcctccc ggtgctggc cgccgacgccc aggtcctctg catggattac aaccgcagcg 780  
 aggccaccac ggcgcccccc aggccttcc cagccaagcc cacccttcca ggcccggcag 840  
 gggcgccggc ctcggggggc gaatgccccg ctggggccc gttcgtgtgc aagtgtcg 900  
 agcccttcgt gcccattctg aaggagtcac acccgctcta caacaagggtg cggacggcc 960  
 aggtgcctaa ctgcgcggta ccctgctacc agccgtcctt cagtgccgac gagcgcacgt 1020  
 tcgcccacctt ctggataggc ctgtggtcgg tgctgtgctt catctccacg tccaccacag 1080  
 tggccacctt cctcatcgac atggacacgt tccgctatcc tgagcgcctt atcatttcc 1140  
 tgtcagcctg ctacctgtgc gtgtcgctgg gtttcctggt gcgtctggc gtggccatg 1200  
 ccagcgtggc ctgcagccgc gagcacaacc acatccacta cgagaccacg ggccctgcac 1260  
 tgtgcacccat cgtcttcctc ctggtctact tcttcggcat ggccagctcc atctgggtgg 1320  
 tcatccgtc gtcacccctt ttcctggccg ccgcgtatgaa gtggggcaac gaggccatcg 1380  
 cgggctacgg ccagtacttc cacctggctg cgtggctcat ccccagcgtc aagtccatca 1440  
 cggcactggc gctgagctcc gtggacgggg acccagtgcc cggcatctgc tacgtggca 1500  
 accagaacct gaactcgctg cggcgcttcg tgctggccc gctggtgctc tacctgctgg 1560  
 tggcacgct cttcctgctg gcgggcttcg tgcgtctt cccgatccgc agcgtcatca 1620  
 agcagggcgg caccaagacg gacaagctgg agaagctcat gatccgcata ggcatacttca 1680  
 cgctgctcta cacggcccccc gccagcatgg tggtgccctg ctacctgtac gagcagcact 1740  
 accgcgagag ctgggaggcg ggcgtcacct ggcgcctgccc gggccacgac accggccagc 1800  
 cgcgcgccaa gcccggatc tgggtgctca tgctcaagta cttcatgtgc ctgggggtgg 1860  
 gcatcacgtc gggcgtctgg atctggtcgg gcaagacggt ggagtcgtgg cggcgatca 1920  
 ccagccgctg ctgctgccgc ccgcggcgccg gccacaaagag cggggccgccc atggccgcag 1980  
 gggactaccc cgaggcgagc ggcgcgtca caggcaggac cgggcccggccg ggccccggcc 2040  
 ccacctacca caagcaggtg tccctgtcgc acgtgttagga ggctgccgccc gagggactcg 2100  
 gccggagagc tgaggggagg gggcgtttt gtttggtagt ttgccaagg tcacttcgt 2160  
 ttacccat ggtgctgtt cccctcccg cggcgacttg gagagaggaa agagggcgt 2220  
 ttgcaggaa gaacctgtcc caggcttct ccaaggggcc cagctcacgt gtattctatt 2280

ttgcgtttct tacctgcctt ctttatggga acccttttt taatttat gtat 2334  
 <210>6  
 <211>570  
 <212>PROTEIN  
 <213>RATTUS SP.  
 <400>6

Met	Arg	Ala	Arg	Ser	Ala	Leu	Pro	Arg	Ser	Ala	Leu	Pro	Arg	Leu
		5				10						15		
Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Ala	Ala	Gly	Pro	Ala	Gln	Phe
		20				25						30		
His	Gly	Glu	Lys	Gly	Ile	Ser	Ile	Pro	Asp	His	Gly	Phe	Cys	Gln
		35				40						45		
Pro	Ile	Ser	Ile	Pro	Leu	Cys	Thr	Asp	Ile	Ala	Tyr	Asn	Gln	Thr
		50				55						60		
Ile	Met	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	His	Thr	Asn	Gln	Glu	Asp	Ala	Gly
		65				70						75		
Leu	Glu	Val	His	Gln	Phe	Tyr	Pro	Leu	Val	Lys	Val	Gln	Cys	Ser
		80				85						90		
Pro	Glu	Leu	Arg	Phe	Phe	Leu	Cys	Ser	Met	Tyr	Ala	Pro	Val	Cys
		95				100						105		
Thr	Val	Leu	Glu	Gln	Ala	Ile	Pro	Pro	Cys	Arg	Ser	Ile	Cys	Glu
		110				115						120		
Arg	Ala	Arg	Gln	Gly	Cys	Glu	Ala	Leu	Met	Asn	Lys	Phe	Gly	Phe
		125				130						135		
Gln	Trp	Pro	Glu	Arg	Leu	Arg	Cys	Glu	His	Phe	Pro	Arg	His	Gly
		140				145						150		
Ala	Glu	Gln	Ile	Cys	Val	Gly	Gln	Asn	His	Ser	Glu	Asp	Gly	Thr
		155				160						165		
Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Thr	Ala	Pro	Pro	Ser	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly

170	175	180
Ala Gly Gly Thr Pro Gly Gly Pro Gly Gly Gly Ala Pro Pro		
185	190	195
Arg Tyr Ala Thr Leu Glu His Pro Phe His Cys Pro Arg Val Leu		
200	205	210
Lys Val Pro Ser Tyr Leu Ser Tyr Lys Phe Leu Gly Glu Arg Asp		
215	220	225
Cys Ala Ala Pro Cys Glu Pro Ala Arg Pro Asp Gly Ser Met Phe		
230	235	240
Phe Ser His His His Thr Arg Phe Ala Arg Leu Trp Ile Leu Thr		
245	250	255
Trp Ser Val Leu Cys Cys Ala Ser Thr Phe Phe Thr Val Thr Thr		
260	265	270
Ser Leu Val Ala Met Gln Arg Phe Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile		
275	280	285
Ile Phe Leu Ser Gly Cys Tyr Thr Met Val Ser Val Ala Tyr Ile		
290	295	300
Ala Gly Phe Val Leu Gln Glu Arg Val Val Cys Asn Glu Arg Phe		
305	310	315
Ser Glu Asp Gly Tyr Arg Thr Val Gly Gln Gly Thr Lys Lys Glu		
320	325	330
Gly Cys Thr Ile Leu Phe Met Met Leu Tyr Phe Phe Ser Met Ala		
335	340	345
Ser Ser Ile Trp Trp Val Ile Leu Ser Leu Thr Trp Phe Leu Ala		
350	355	360
Ala Gly Met Lys Trp Gly His Ala Ala Ile Glu Ala Asn Ser Gln		
365	370	375
Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Ala Val Pro Ala Val Lys Thr Ile		
380	385	390

Thr Ile Leu Ala Met Gly Gln Ile Asp Gly Asp Leu Leu Ser Gly  
 395 400 405  
 Val Cys Phe Val Gly Leu Asn Arg Leu Asp Pro Leu Arg Gly Phe  
 410 415 420  
 Val Leu Ala Pro Leu Phe Val Tyr Leu Phe Ile Gly Thr Ser Phe  
 425 430 435  
 Leu Leu Ala Gly Phe Val Ser Leu Phe Arg Ile Arg Thr Ile Met  
 440 445 450  
 Lys His Asp Gly Thr Lys Thr Glu Pro Leu Glu Arg Leu Met Val  
 455 460 465  
 Arg Ile Gly Val Phe Ser Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Ile  
 470 475 480  
 Val Ile Ala Cys Tyr Phe Tyr Glu Gln Ala Phe Arg Glu His Trp  
 485 490 495  
 Glu Arg Ser Trp Val Ser Gln His Cys Lys Ser Leu Ala Ile Pro  
 500 505 510  
 Cys Pro Ala His Tyr Thr Pro Arg Thr Ser Pro Asp Phe Thr Val  
 515 520 525  
 Tyr Met Ile Lys Tyr Leu Met Thr Leu Ile Val Gly Ile Thr Ser  
 530 535 540  
 Gly Phe Trp Ile Trp Ser Gly Lys Thr Leu His Ser Trp Arg Lys  
 545 550 555  
 Phe Tyr Thr Arg Leu Thr Asn Ser Arg His Gly Glu Thr Thr Val  
 560 565 570

&lt;210&gt;7

&lt;211&gt;1912

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;RATTUS SP.

&lt;400&gt;7

aggggaaggc gcgcggtctc tgggttgggg gcgggggctg gggggcgccc aggagccgag 60  
 tggggggcgg cggccagcat gcgggcccgc agcgccctgc cccgcagcgc cctgccccgc 120  
 ctgctgctgc cactgctgct gctgccggct gccggccgg ctcagttcca cggggagaag 180  
 ggcatctcca tcccgacca cggcttctgc cagccatct ccattccgct gtgcacggac 240  
 atgcctaca accagaccat catgccaac cttcttggc acacgaacca agaggacgac 300  
 ggcctggagg tgcatcaatt ctacccgctg gtgaaggtgc agtgctcgcc cgagctgcgc 360  
 ttcttcgt gctccatgta cgctccggtg tgcacggtg tggagcaggc catccgccc 420  
 tgccgctcca tctgcgaacg cgcgccaa ggctgcgagg cgctcatgaa caagttcggc 480  
 ttccagtggc ccgagccct ccgctgcgag cattccgc gtcacggcgc ggagcagatc 540  
 tgcgtggcc agaaccactc cgaggacgga actcctgcgc tactcaccac cgccaccg 600  
 tctggctgc agcctggcgc tggtggcacc cggggccgc ctggccggtg tggcgccccc 660  
 ccgcgtacg ccactctgga gcacccttc cactgtcccc gcgtcctcaa ggtgccgtcc 720  
 tatctcagct ataagttct gggtagcgc gattgtgccg cgccctgcga gcctgcacgg 780  
 cccgacggct ccatgttctt ctgcaccac cacactcggt ttgcccgtct ctggatcctc 840  
 acatggtcgg tgctgtgctg cgcttctact ttcttcacgg tcaccaccc tttagtggcc 900  
 atgcagcgat tccgctaccc agagcggccc atcatctcc tgtccggttg ctacaccatg 960  
 gtgtcagtgg cctacattgc gggcttcgtg ctccaggagc gcgtggtgca acagcgcgc 1020  
 ttctctgagg acggttatcg cacggtgaaa cagggacta agaaagaagg ctgtactata 1080  
 ctcttcatga tgctctactt cttagtata gccagctcca tctggtggtt gattctgtcc 1140  
 ctcacctggt tcctggcagc cggtatgaag tggggccacg cggccatcga ggccaattcg 1200  
 cagttcc acctggccgc ctggccggtg cggccgtca aaaccatcac catcctggcc 1260  
 atggccaga tcgacggcga cctgctgagc ggcgtgtgct tcgtggccct caacaggctg 1320  
 gacccgctgc gaggcttcgt gctggcgccg ctcttcgtgt acctgttcat cggcacatcc 1380  
 ttctgtgg cgggcttcgt gtcactcttc cgcatccgca ccatcatgaa gcacgacggc 1440  
 accaagacgg agccgctgga gaggctcatg gtgcgtatcg gcgtttctc cgtgtctac 1500  
 accgtaccgg ccaccatgt catgcctgc tacttctatg agcaggcctt cgcgcagcac 1560  
 tgggagcgt cgtggtaag ccagcactgc aagagcctag ccatcccgt cccggccac 1620  
 tacaccccc gcacgtcgcc cgacttcaca gtctacatga tcaaataacct catgacgctc 1680  
 atcgtggca tcacgtcggtt cttctggatc tggtccggca agacgctgca ctcgtggagg 1740

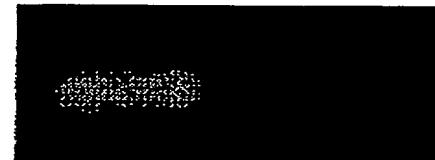
aagttctaca cggtctcac caacagccgg catggagaga ccaccgtgtg aagcggtctc 1800  
gctgctggc gccccctct cccaggtccg gactgcaacc gtgccctcct tcactcgga 1860  
gggggtgca ccctacggac tcctattttt ttttttaaa taaagaacag tg 1912  
<210>8  
<211>27  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
<400>8  
  
aatgtttcc aagttttcc tagtggc 27  
<210>9  
<211>22  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
<400>9  
  
gatgtcgaa ttgatactgg ca 22  
<210>10  
<211>20  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
<400>10  
  
accacagtcc atgccatcac 20  
<210>11  
<211>20  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
<400>11  
  
tccaccaccc tggctgtta 20

【書類名】図面

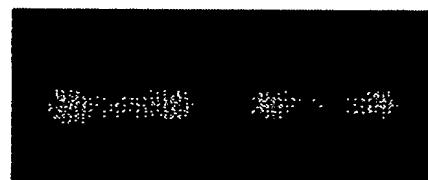
【図1】

DPC HFC

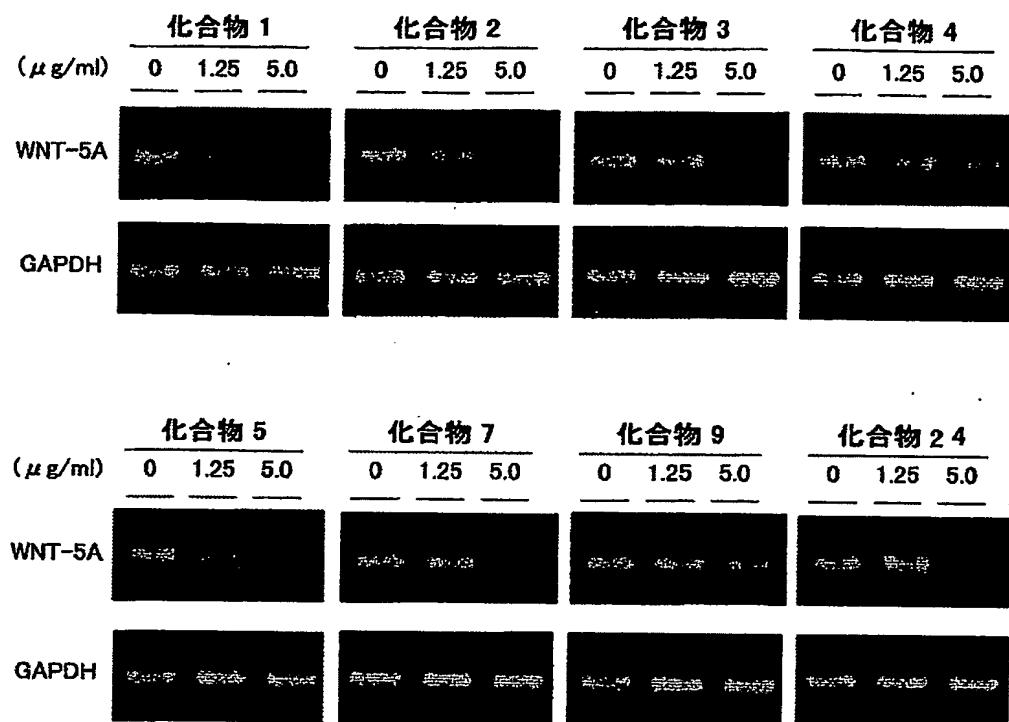
WNT-5A



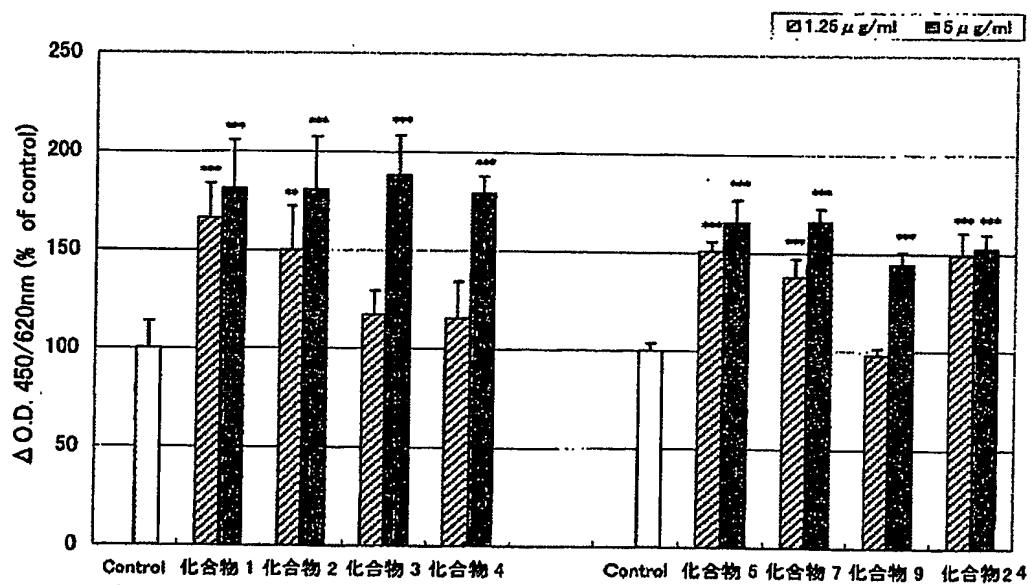
GAPDH



【図2】



【図3】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】新規な作用機序による発毛剤／育毛剤を提供する。

【解決手段】WNT-5A機能を阻害する化合物を有効成分とする発毛剤／育毛剤。

【選択図】なし。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-115529
受付番号	50200563011
書類名	特許願
担当官	第四担当上席 0093
作成日	平成14年 4月18日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年 4月17日

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [000002819]

1. 変更年月日 1990年 8月22日

[変更理由] 新規登録

住所 東京都豊島区高田3丁目24番1号  
氏名 大正製薬株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**